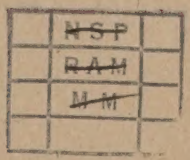
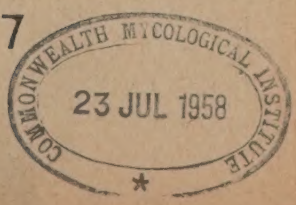
ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VI No 3

1 9 5 7





KOMUNIKAT

Komitet Mikrobiologiczny PAN powiadamia, że w Czechosłowacji rozpoczęto wydawanie międzynarodowego kwartalnika, poświęconego zagadnieniom wirusologii pt. *Acta Virologica.*

Redaktorem naczelnym czasopisma jest prof. Blaškowic, redaktorem krajowym w Polsce — prof. dr F. Przesmycki. Maszynopisy prac przeznaczonych do publikacji należy kierować na adres prof. Przesmyckiego: Warszawa, Chocimska 24, Państwowy Zakład Higieny.

KOMUNIKAT

Czasopismo *Journal of Applied Bacteriology* ukazuje się normalnie dwa razy w roku (czerwiec i grudzień). W roku 1957 ukaże się trzeci numer, zawierający prace referowane na specjalnym Sympozjum Towarzystwa Stosowanej Bakteriologii, poświęconym przetrwalnikom bakteryjnym.

Wszelką korespondencję, dotyczącą prenumeraty czasopisma itp. należy kierować na adres: A. H. Walters, Honorary Publications Manager, Society for Applied Bacteriology, Milton-Deosan Research Laboratory, 64 Wimpole Street, London, W. 1., Anglia.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VI No 3

1957
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Natalia Balicka

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WROCŁAW 1957

Nakład 1053+150 egz.	*Oddano do składania 6. VII. 1957 r.*
Ark. wyd. 7.25, druk. 6,5	*Podpisano do druku 17. I. 1958 r.*
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g+kreda 90 g	*Druk ukończono w styczniu 1958 r.*
Cena zł 25.–	*Zam. nr 982/57 — P-2*

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 211-218

S. Szydłowski, M. Rolicka i *B. Zabłocki*

OTRZYMYWANIE OCZYSZCZONYCH PREPARATÓW KWASU HIALURONOWEGO DO MIARECZKOWANIA ENZYMU-HIALURONIDAZY

Z Katedry Mikrobiologii Szczegółowej Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

Wpłynęło dnia 10 kwietnia 1957 r.

Roztwory kwasu hialuronowego są niezbędne do oznaczania miana hialuronidazy przy posługiwaniu się metodami fizyko-chemicznymi (wiskozymetryczna, turbidimetryczna), metodą Mc Cleana (mucin clot prevention test) i metodą Zabłockiego (zniesienie własności przyśpieszenia szybkości opadania krwinek przez substrat enzymu). Użycie niedostatecznie oczyszczonych preparatów kwasu hialuronowego prowadzi do otrzymania wyników niejednolitych, zwłaszcza przy oznaczaniu zawartości hialuronidazy wytworzonej w hodowlach bakteryjnych (Zabłocki, Szydłowski i Gorzelak, 1954, Zabłocki 1955). Najlepszym źródłem do otrzymywania czystych preparatów kwasu hialuronowego jest płyn synowialny. Jednak w praktyce źródło to jest trudno osiągalne i wydajność kwasu hialuronowego jest niska. Zazwyczaj kwas hialuronowy wyodrębnia się z ciałek szklistych bydlęcych, z pępowin, z tkanek nowotworów (*sarcoma Rousa*) i z grzebieni kogucich. Wydajność oczyszczonych preparatów kwasu hialuronowego jest następująca: z 1 kg tkanki nowotworu Rousa Alburn i Williams (1950) otrzymali około 1 g; ci sami badacze otrzymali z 300 funtów oczu bydlęcych 5-6 g oczyszczonego kwasu hialuronowego. Preparaty kwasu hialuronowego otrzymane różnymi metodami z tych źródeł zawierają dużo zanieczyszczeń (białka i inne zanieczyszczenia azotowe, glikogen, siarczany organiczne i inne). Zanieczyszczeń białkowych pozbywano się albo za pomocą trawienia trypsyną i pepsyną (Alburn i Williams, 1950, Hadidian i Pirie, 1948, Follett, 1948), albo metodą Sevaga (Boas, 1949, Meyer, 1947 i inni). Inne zanieczyszczenia azotowe można było wyadsorbować z roztworów kwasu hialuronowego na wodorotlenku cynku

w *pH* 7,2. Domieszki glikogenu usuwa się za pomocą trawienia amylazą. Usuwanie domieszek siarczanów organicznych jest zadaniem trudnym i powoduje straty preparatu końcowego.

Dawny pogląd, że kwas hialuronowy jest zwykłym linearnym polimerem dwucukru (kwas glikuronowy + acetyloglikozoamina w stosunku ekwimolarnym), został ostatnio poddany krytyce. Badania G r o s s a (1950) nad strukturą kwasu hialuronowego wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazują obecność rozgałęzionych i anastomozujących włókien oraz gdzieniegdzie występujących układów pierścieniowych i gwiaździstych.

Oczyszczone preparaty kwasu hialuronowego wykazują mniejszą lepkość niż preparaty wyjściowe.

Oczyszczone preparaty kwasu hialuronowego bada się na zawartość: azotu, glikozoaminy, kwasu glikuronowego i popiołu.

METODA OTRZYMYWANIA OCZYSZCZONEGO KWASU HIALURONOWEGO

Jako produktu wyjściowego użyto preparatu kwasu hialuronowego natywnego otrzymanego z pępowin techniką opisaną przez nas w r. 1954 (Z a b ł o c k i i w s p ó ł p r a c o w n i c y, 1954). Sproszkowany natywny kwas hialuronowy rozpuszczono w 5-procentowym roztworze octanu sodowego przez dokładne ucieranie w moździerzu. Po odwirowaniu i zlaniu roztworu kwasu hialuronowego, pozostały osad ponownie ucierano w moździerzu z rozpuszczalnikiem. Czynność tę powtarzano 10-krotnie. Ogółem zużyto 1,5 litra 5-procentowego roztworu octanu sodowego do ekstrakcji 6,0 g kwasu hialuronowego natywnego otrzymanego z 1,5 kg pępowin. Zmieszane roztwory kwasu hialuronowego zakwaszono do *pH* 6,0 za pomocą 10-procentowego roztworu HCl. Kwas hialuronowy wytrącono przez dodanie 2 objętości etanolu 96% i zostawiono przez 24 godziny w chłodni (w temperaturze 0°). Osad kwasu hialuronowego odwirowano, wysuszono w próżni i utarto na proszek (preparat Kh_1).

Proszek Kh_1 rozpuszczono w 5-procentowym roztworze octanu sodowego i ponownie wytrącono kwas hialuronowy 96-procentowym etanolem jak wyżej, otrzymując preparat Kh_2. Z proszku Kh_2 (zawierającego dużą domieszkę białka) sporządzono 1-procentowy roztwór w 5-procentowym roztworze octanu sodowego. Roztwór kwasu hialuronowego poddano odbiałczaniu metodą Sevaga (wytrząsanie z mieszaniną chloroformu i alkoholu amylowego). Stosowano następujący stosunek objętościowy płynów: na 1 objętość roztworu kwasu hialuronowego brano 0,4 objętości chloroformu i 0,15 objętości alkoholu amylowego. Dla całkowitego usunięcia zanieczyszczeń białkowych czynność wytrząsania z mieszaniną chlo-

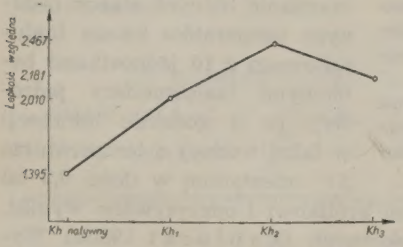
roformu i alkoholu amylowego powtórzono 36 razy. Z odbiałczonego roztworu wytrącono kwas hialuronowy za pomocą dodatku 4 objętości 96-procentowego etanolu. Po 24-godzinnym przetrzymaniu w chłodni osad odwirowano, wysuszono w próżni i sproszkowano (preparat Kh_3).

Preparat Kh_3 oczyszczonego kwasu hialuronowego ma postać białego proszku (o lekko kremowym odcieniu), rozpuszczającego się całkowicie w wodzie i roztworze fizjologicznym NaCl. Preparat ten otrzymano w ilości 2,875 g. Wydajność metody wynosi zatem 46,9%.

WŁAŚCIWOŚCI OCZYSZCZONEGO PREPARATU (Kh_3) KWASU HIALURONOWEGO

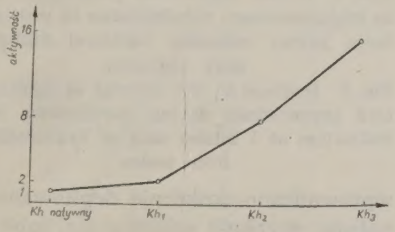
Porównawczo oznaczono następujące właściwości kolejno otrzymanych preparatów kwasu hialuronowego (*Kh* natywny, Kh_1, Kh_2, Kh_3):

1. określano lepkość względną 0,1% roztworów za pomocą wiskozymetru Höpplera,
2. oznaczano najmniejsze dawki przyśpieszające szybkość opadania krwinek czerwonych,
3. oznaczano najmniejsze ilości badanych preparatów kwasu hialuronowego, które przy połączeniu z 1 jednostką bąblową hialuronidazy jądrowej znoszą jej działanie *in vivo*.



Rys. 1. Lepkości względne preparatów 0,1% roztworów kwasu hialuronowego w miarę oczyszczania

Fig. 1. Changes of relative viscosity of 0,1% solution of hyaluronic acid during purification



Rys. 2. Wzrost aktywności preparatów kwasu hialuronowego w miarę oczyszczania. Wpływ na zwiększoną szybkość opadania krwinek

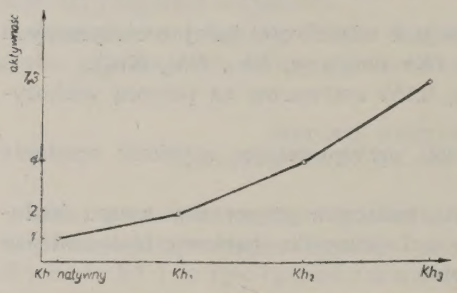
Fig. 2. Increase in the activity of hyaluronic acid preparations during purification. Effect on the red blood cells sedimentation rate

Na rys. 1 zestawiono dane dotyczące wartości lepkości względnej preparatu *Kh* natywnego, Kh_1, Kh_2 i Kh_3.

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa stwierdza się stosunkowo znaczny wzrost lepkości względnej preparatów kwasu hialuronowego w miarę

oczyszczania oraz nieznaczny spadek lepkości w ostatniej fazie oczyszczania, tj. po odbiałczeniu metodą Sevaga (preparat Kh_3).

Najmniejsze dawki powodujące przyśpieszenie szybkości opadania krwinek czerwonych oznaczono metodą Zabłockiego (1950a). Wyniki doświadczeń przedstawia rys. 2. Wynika z nich, że w miarę oczyszczania następuje wybitny wzrost aktywności preparatów kwasu hialuronowego: najmniejsza dawka przyśpieszająca szybkość opadania krwinek preparatu Kh_3 jest 16 razy mniejsza od najmniejszej dawki przyśpieszającej preparatu *Kh* natywnego. Ponieważ przyśpieszenie szybkości opadania krwinek przez kwas hialuronowy pozostaje w ścisłej zależności od długości nitek tego kwasu (stopnia polimeryzacji), dane powyższe świadczą o tym, że w trakcie oczyszczania kwasu hialuronowego nie zachodzi depolimeryzacja jego cząsteczek.



Rys. 3. Wzrost aktywności preparatów kwasu hialuronowego; zobojętnianie *in vivo* działania jednej jednostki bąblowej hialuronidazy jądrowej

Fig. 3. Increase in the activity of hyaluronic acid preparations during purification. Neutralisation of 1 blister unit of hyaluronidase from testes

Najmniejsze dawki poszczególnych preparatów kwasu hialuronowego, które w połączeniu z 1 jednostką bąblową hialuronidazy jądrowej znoszą jej działanie *in vivo*, oznaczono przez mieszanie różnych stężeń badanych preparatów kwasu hialuronowego z 10 jednostkami bąblowymi hialuronidazy jądrowej; po 1 godzinie inkubacji w łaźni wodnej o temperaturze 37° mieszaninę w ilości 0,2 ml wprowadzano doskórnie depilowanemu królikowi i odczytywano wyniki, notując szybkość spłaszczania bąbli skórnych (Zabłocki 1950b). Wyniki doświadczeń przedstawia rys. 3. W miarę oczyszczania występuje wyraźny wzrost aktywności preparatów kwasu hialuronowego. Aktywność preparatu Kh_3 jest 7,3 razy większa od aktywności preparatu kwasu hialuronowego natywnego.

WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE OCZYSZCZONEGO PREPARATU KWASU HIALURONOWEGO Kh_3

Azot oznaczono mikrometodą Kjeldahla w aparacie Markhama (opis aparatu podany jest w książce Kabata i Mayera, 1948). Średnia arytmetyczna 3 oznaczeń (1,96% 1,995% 1,984%) wynosi 1,98% N. Ilość azotu w preparacie Kh_3 jest nieco niższa (ale nie wyższa) od ilości przy-

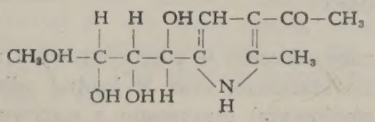
padającej na azot aminowy w acetyloglikozoaminie, jeśli przyjąć, że acetyloglikozoamina i kwas glikuronowy występują w stosunku ekwimolarnym. W każdym razie wykryta w preparacie Kh_3 ilość azotu świadczy o tym, że preparat ten jest całkowicie pozbawiony domieszki białka i innych związków azotowych.

Zawartość kwasu glikuronowego w preparacie Kh_3 oznaczono zmodyfikowaną metodą Dicksona, Ottersona i Linka. Podstawą chemiczną tej metody jest reakcja zachodząca przy ogrzewaniu kwasu uronowego z 12-procentowym HCl:

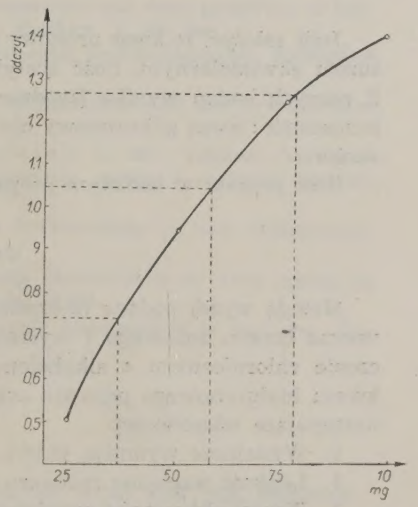
$$C_6H_{10}O_7 \longrightarrow C_5H_4O_2 + \uparrow CO_2 + 3H_2O$$

Wydzielający się CO_2 ulega związaniu przez 0,1 n roztwór $Ba(OH)_2$. Średnia arytmetyczna 3 oznaczeń kwasu uronowego (27,78%, 27,75% i 27,80%) wynosi 27,78%.

Zawartość glikozoaminy w preparacie Kh_3 oznaczono metodą Elsona i Morgana. Podstawą chemiczną tej metody jest reakcja kondensacji aminocukrów przy ogrzewaniu z acetyloacetonem:



3-acetylo-2-metylo-5-tetrahydroksybutylo-pyrol



Rys. 4. Krzywa wzorcowa dla oznaczenia glikozaminy
Fig. 4. Standard curve for glucosamine

Powstały produkt kondensacji daje z p-dwumetyloaminobenzaldehydem czerwone zabarwienie. Do oznaczenia zawartości glikozoaminy w preparacie badanym trzeba sporządzić krzywą wzorcową glikozoaminy (rys. 4) na podstawie czterech znanych stężeń tego związku. Na rys. 4 podane zostały wyniki czterech odczytów roztworów glikozoaminy o znanych stężeniach i trzech odczytów badanych próbek Kh_3 na zawartość glikozoaminy.

Średnia zawartość glikozoaminy w badanym preparacie Kh_3 wynosi 37,7%.

Wzorcowe roztwory glikozoaminy (mg na 1 ml roztworu)	Odczyt
10,0	1,4
7,5	1,25
5,0	0,95
2,5	0,51

Roztwory preparatu Kh_3 (mg na 1 ml roztworu)	Odczyt	% glikozoaminy
20	1,26	38,5
15	1,05	38,6
10	0,75	36,0
	średnia	37,7%

Na podstawie oznaczenia zawartości glikozoaminy można obliczyć zawartość acetyloglikozoaminy:

$$\frac{37{,}7\% \cdot \text{c. cząst. acetyloglikozoaminy}}{\text{c. cząst. glikozoaminy}} = 49{,}86\%$$

Jeśli założyć, że kwas uronowy i acetyloglikozoamina występują w stosunku ekwimolarnym, ilość acetyloglikozoaminy powinna wynosić 55%. Z naszych badań wynika (zgodnie z ostatnimi poglądami), że acetyloglikozoamina i kwas glikuronowy nie występują w ściśle ekwimolarnym stosunku.

Ilość popiołu w badanym preparacie Kh_3 wynosi 10,37%.

WNIOSKI

Metodą wyżej podaną (3-krotne rozpuszczenie w 5-procentowym roztworze octanu sodowego i wytrącenie etanolem, oraz 36-krotne odbiałczenie chloroformem z alkoholem amylowym) otrzymano z natywnego kwasu hialuronowego pępowin oczyszczony preparat Kh_3, który posiadał następujące właściwości:

1. Wydajność wynosiła 46,9%.
2. Lepkość względna roztworu 0,1% wzrosła z 1,395 do 2,181.
3. Wzrost aktywności przyśpieszenia szybkości opadania krwinek czerwonych wyrażał się liczbą 16 w porównaniu do preparatu wyjściowego.
4. Wzrost aktywności niwelowania 1 jednostki bąblowej jądrowej hialuronidazy wyrażał się liczbą 7,3 w porównaniu do preparatu wyjściowego.
5. Ilość azotu wynosiła 1,98%; taka ilość azotu świadczy o całkowitym oczyszczeniu kwasu hialuronowego z domieszek białka i innych zanieczyszczeń azotowych.
6. Badania chemiczne wykazały, że ilość kwasu uronowego wynosi 27,78%, a acetyloglikozoaminy — 49,86%. Ilość popiołu wynosi 10,37%.

7. Otrzymany preparat Kh_3 kwasu hialuronowego rozpuszcza się całkowicie w wodzie i roztworze fizjologicznym NaCl i nadaje się do ilościowych oznaczeń hialuronidazy przy pomocy metod fizyko-chemicznych.

LITERATURA

Alburn H. E. i Williams E. C. 1950: Preparation of hyaluronic acid from various animal sources, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **52**: 971.

Boas N. 1949: Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb, *J. Biol. Chem.*, **181**: 573.

Dickson A. D., Otterson H. i Link K. P. cyt. wg Kabata i Mayera.

Follett A. E. 1948: Preparation and some properties of hyaluronic acid from umbilical cord of the pig, *J. Biol. Chem.*, **176**: 177.

Gross J. 1950: A study of certain connective tissue constituants with the electron microscope, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **52**: 964.

Hadidian Z. i Pirie N. W. 1948.: The preparation and some properties of hyaluronic acid from human umbilical cord, *Biochem. J.*, **42**: 260.

Kabat E. A. i Mayer M. M. 1948: Experimental Immunochemistry, Springfield — Illinois, Charles Thomas.

Meyer K. 1947: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase, *Physiol. Rev.*, **27**: 335.

Zabłocki B., Szydłowski S. i Gorzelak Z. 1954: Lepkość roztworów kwasu hialuronowego a własność przyspieszania szybkości opadania krwinek, *Med. dośw. i Mikrobiol.*, **6**: 151.

Zabłocki B. 1955: Badania nad układem hialuronidaza — kwas hialuronowy. Łódzkie T-wo Naukowe. Łódź, PWN.

Zabłocki B. 1950: Nowa metoda oznaczania hialuronidazy *in vitro* oparta na zjawisku opadania krwinek, *Pol. Tyg. Lek.*, **5**: 521.

Zabłocki B. 1950: Odmiana metody oznaczania hialuronidazy *in vivo*. *Pol. Tyg. Lek.*, **5**: 922.

S. Szydłowski, M. Rolicka and *B. Zabłocki*

THE OBTAINING OF PURIFIED HYALURONIC ACID FOR THE PURPOSE OF TITRATION OF THE ENZYME — HYALURONIDASE

Summary

The authors give the description of a method of obtaining the purified preparation Kh_3 from a native hyaluronic acid. The native preparation was 3 times reprecipitated by alcohol in 5% sodium acetate and redissolved in 5% sodium acetate; then 36 times deproteinised by Sevag's method in mixture of chloroform and amyl alcohol. The product Kh_3 had following properties:

1. The yield of preparation was 46 per cent of native hyaluronic acid.
2. The viscosity of 0,1 per cent solution increased from 1,395 to 2,181.

3. The property of the acceleration of the red blood cells sedimentation increased 16-fold against the native product.

4. The increase of activity in inhibition of 1 blister unit was 7,3.

5. The preparation Kh_3 contained only 1,98 per cent of nitrogen. The small nitrogen content is a proof for the purification from proteins and other nitrogen residues.

6. By use of chemical methods the authors found the amount of glucuronic acid to be 27,78 per cent, of acetylglucosoamine 49,86 per cent; the percentage of ashes was 10,37.

7. The preparation Kh_3 of hyaluronic acid was soluble in water and in physiological saline and could be used as a good standard substrate for hyaluronidase titration by physico-chemical tests.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 219-231

Jerzy Pawełkiewicz i *Karol Zodrow*

WYTWARZANIE KOBALAMIN PRZEZ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Z Katedry Biochemii i z Katedry Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu

Wpłynęło dnia 31 maja 1957 r.

Pawełkiewicz i Zodrow (1956a) stwierdzili, że *Propionibacterium shermanii*, syntetyzujący znaczniejsze ilości kobalamin, posiada zdolność wytwarzania wolnych porfiryn przy niedostatecznej ilości żelaza jonowego w pożywce. Jest rzeczą znaną, że analogiczną zdolność syntezy wolnych porfiryn posiada *Corynebacterium diphtheriae* (Pappenheimer, 1947). W obu wypadkach dodatek żelaza jonowego hamuje syntezę wolnych porfiryn. Podobne działanie, lecz znacznie słabsze, wywiera dodatek jonów kobaltawych (Pawełkiewicz i Zodrow, 1956, Clarke i Clarke, 1953). Na podstawie tych spostrzeżeń zwrócono uwagę na biochemiczne podobieństwo obu gatunków (Pawełkiewicz i Zodrow, 1956a, 1956b).

Podobieństwo wymienionych cech biochemicznych pozwalało przypuszczać, że analogicznie jak *P. shermanii* również i *C. diphtheriae* może wytwarzać kobalaminy. Za tym przypuszczeniem przemawiała także postawiona przez Pawełkiewicza i Zodrowa (1956b) hipoteza, że synteza kobalamin przebiega podobnie jak synteza porfiryn poprzez kwas δ-aminolewulinowy. Hipotezę tę doświadczalnie potwierdzili później Shemin i współpracownicy (1956) oraz Smith (1956).

Zdolność *C. diphtheriae* do syntezy kobalamin potwierdzono doświadczalnie, o czym autorzy podali w doniesieniu (1956 b).

Praca niniejsza podaje szczegóły badań nad wytwarzaniem kobalamin przez *C. diphtheriae*.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

SZCZEPY *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Badania wykonano na szczepach wymienionych w tabeli I. Szczepy przechowywano na pożywce Loefflera.

Tabela I

Zestawienie szczepów *C. diphtheriae* użytych do doświadczeń
Examined strains of *C. diphtheriae*

Nr szczepu No. of strain	Pochodzenie szczepu Source of strain	Określenie szczepu Designation of strain
1	Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Poznaniu	Wyizolowany od pacjenta Isolated from throat
2		
3		*P. W. 8*
4		Nr *3238/56*
5		Nr *3216/56*
6		Nr *2488/56*
7		Nr *3022/56*
8	Państwowy Zakład Higieny w Warszawie	Nr *44*/typ *gravis*
9		Nr *129*/typ *intermedius*
10		Nr *207/P.W.8* — Kopenhaga
11		Nr *556/P.W.8 A. 102* — Inst. Pasteura
12		Nr *380/P.W.8* — Weissensee

METODY HODOWLANE

Hodowle przeprowadzano w termostacie-trzęsawce, w temperaturze 29-30°. Trzęsawka wykonywała 80 pełnych wahań na minutę, przy długości przesuwu 10 cm. Hodowle prowadzono przeważnie przez okres 40-70 godzin.

Hodowle wyjściowe uzyskiwano przez zaszczepienie jednej lub kilku kolbek z pożywką bakteriami pobranymi uszkiem z pożywki Loefflera. Po około 48-godzinnej inkubacji hodowlami tymi zaszczepiano używane w doświadczeniach kolbki z pożywką. Każdą kolbkę doświadczalną zaszczepiano 10 ml kultury wyjściowej. Do badań używano pożywki doświadczalnej o składzie podanym poniżej:

Pożywka doświadczalna

	Składniki	Na 1000 ml
1	Hydrolizat kwasowy kazeiny	100 ml
2	Hydrolizat enzymatyczny kazeiny	400 „
3	Roztwór $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (4,4 g w 100 ml H_2O)	40 „
4	Roztwór K_3PO_4 (4,4 g w 100 ml H_2O)	40 „
5	Roztwór $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2 g w 50 ml H_2O)	10 „
6	Roztwór $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g w 250 ml H_2O)	10 „
7	Roztwór amidu kwasu nikotynowego (150 mg/250 ml)	2 „
8	DL-cysteina HCl (rozp. w rozc. HCl)	100 mg

9	Ekstrakt drożdżowy	8 g
10	Mleczan sodu (4 N roztwór)	6 ml
11	Woda wodociągowa	348 „

Nastawić *pH* na 6,8 — rozlać po 145 ml do kolb Erlenmayera o pojemności 1000 ml i wyjałowić przez 15 minut w temperaturze 110°

12	Roztwór $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (100 mg/100 ml H_2O)	10 ml
13	Roztwór biotyny (15 mg/500 ml H_2O)	3 „
14	Roztwór pantotenianu Ca (100 mg/250 ml H_2O)	3 „
15	Roztwór glukozy (20-procentowy)	20 „

Wyjałowione roztwory, wymienione pod nrami 12, 13, 14 i 15 mieszano w podanych proporcjach i dodawano jałowo po 5 ml do każdej kolbki Erlenmayera. Po dodaniu składników 12—15 nastawiano *pH* pożywki na 7,4—7,5 dodając do każdej kolbki odpowiednią ilość jałowego roztworu Na_2CO_3.

Kwasowy hydrolizat kazeiny otrzymano w następujący sposób: Do 1200 g kazeiny handlowej dodawano 3600 ml HCl (1 : 1) i ogrzewano na łaźni wodnej aż do rozpuszczenia się kazeiny, a następnie przez 10 godzin na siatce azbestowej pod chłodnicą zwrotną. Uzyskany surowy hydrolizat przesączano, a przesącz zagęszczano w próżni do konsystencji gęstego syropu. Do syropu dodawano 1 l wody destylowanej i ponownie odparowywano w próżni. Gęstą masę, uzyskaną po drugim odparowaniu, rozpuszczano w 6 l wody, dodawano 150 g węgla aktywowanego (Carbopol H2) i po upływie 1 godziny przesączano. *pH* przesączu doprowadzano stężonym NaOH do 5,5—6,0 i ponownie dodawano 100 g węgla aktywowanego. Po upływie kilku godzin odsączano węgiel. Tak otrzymany hydrolizat zawierał około 1,8—2,0 g N/100 ml hydrolizatu.

Enzymatyczny hydrolizat kazeiny przyrządzano następująco: Jeden kilogram handlowej kazeiny przepłukiwano wodą wodociągową aż do uzyskania czystego, niezabarwionego przesączu. Przemytą kazeinę zawieszano w 10 l wody wodociągowej, dodawano 100 g $NaHCO_3$, 20 g trypsyny rozprowadzonej w 300 ml wody, a następnie około 150 ml benzenu. Mieszaninę silnie wytrząsano i inkubowano w 37° przez 4—6 dni. Po wyjęciu z cieplarki zawartość kolby zakwaszano do *pH* 5,5—6,0 przy użyciu HCl (1 : 1) i ogrzewano przez 1 godzinę w aparacie Kocha. Po ostudzeniu sączono. Przesącz zadawano 100 g węgla aktywowanego „Carbopol H2" i ponownie sączono dla oddzielenia węgla. Tak uzyskany hydrolizat miał barwę jasno-słomkową i zawierał średnio 0,6 g N/100 ml.

Ekstrakt drożdżowy pochodził z Państwowych Zakładów Produkcji Drożdży w Szczecinie. Odważoną ilość ekstraktu rozpuszczano w małej ilości wody, doprowadzono *pH* do wartości 6,5—6,8, zagotowywano i wirowano. Do pożywki używano klarownego płynu znad osadu.

METODA IZOLACJI KOBALAMIN Z HODOWLI *C. DIPHTHERIAE*

W opracowanej metodzie, kobalaminy wyodrębniano z odwirowanych komórek *C. diphtheriae*. W komórkach znajdowała się praktycznie cała ilość wytworzonych kobalamin. Ilości kobalamin, jakie ewentualnie dyfundowały do pożywki, były niewykrywalne metodami chemicznymi. Dla ułatwienia osadzania się komórek w trakcie wirowania, kultury zakwaszano ostrożnie 5 N kwasem siarkowym do *pH* 6,0-6,5. Do odwirowanych

komórek dodawano wody w ilości odpowiadającej 1/3-1/2 objętości pożywki i silnie wytrząsano. Do tak uzyskanej zawiesiny dodawano NaCN w ilości około 25 mg na 100 ml, korygowano *pH* do wartości 6,0-6,5 i autoklawowano 15 minut w temperaturze 110°. Po ostudzeniu próbę odwirowywano, a z klarownego (lub czasem opalizującego) płynu wielokrotnie ekstrahowano kobalaminy małymi objętościami 33-procentowego roztworu fenolu w chloroformie (v/v). Połączone ekstrakty fenolowe, zawierające wszystkie kobalaminy uwolnione z komórek, sączono przez sączek zwilżony 33-procentowym roztworem fenolu w chloroformie. Do klarownego przesączu dodawano 1 objętość chloroformu i $^1/_2$ objętości n-butanolu. Z mieszaniny tej reekstrahowano kilkakrotnie kobalaminy małymi porcjami wody, aż do zupełnego odbarwienia fazy organicznej. Uzyskany wodny koncentrat kobalamin o charakterystycznym zabarwieniu czerwono-fiołkowym oczyszczano dodatkowo ekstrahując jeszcze raz kobalaminy roztworem o-krezolu w chloroformie (1 : 1, v/v). Następnie reekstrahowano je wodą po uprzednim zadaniu ekstraktu krezolowego chloroformem i n-butanolem (P a w e ł k i e w i c z, N o w a k o w s k a, 1955). Ostatecznie uzyskany wodny koncentrat ekstrahowano 3 razy chloroformem dla usunięcia śladów związków fenolowych, po czym odparowywano go do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem na łaźni wodnej. Suchą pozostałość rozpuszczano w określonej objętości wody.

Uzyskany w ten sposób koncentrat służył do ilościowego oznaczania kobalamin oraz do dalszych badań nad ich identyfikacją. Przybliżone stężenia sumy wszystkich zawartych w koncentracie kobalamin obliczano z pomiarów spektrofotometrycznych. Przy obliczaniu przyjęto wspólny dla wszystkich frakcji współczynnik ekstynkcji $E^{1\%}_{1cm} = 105$ (dla fali 580 mμ). Jest to współczynnik ekstynkcji dwucyjanowej pochodnej witaminu B_{12p} (czynnika *B*). Celem przeprowadzenia kobalamin w formę dwucyjanową, około 5 ml koncentratu zadawano małym kryształkiem NaCN. Pomiaru dokonywano na spektrofotometrze Unicam SP 500 po 2 godzinach od chwili dodania cyjanku sodu.

WYNIKI BADAŃ

WYSTĘPOWANIE KOBALAMIN W KULTURACH *C. DIPHTHERIAE*

Jak już podano w doniesieniu (P a w e ł k i e w i c z i Z o d r o w, 1956b), wszystkie badane szczepy wytwarzały kobalaminy. Większość szczepów produkowała nikłe ilości kobalamin. Znaczniejsze ilości kobalamin stwierdzono w kulturach szczepu nr 7. Wynosiły one około 0,8 mg na 1000 ml pożywki. Najbardziej wydajny okazał się szczep nr 8. Poziom kobalamin w hodowlach tego szczepu przekraczał 1 mg/1000 ml pożywki. W jednym z doświadczeń w 60-godzinnej hodowli uzyskano wy-

dajność 1,97 mg kobalamin na 1 l pożywki i dlatego szczep nr *8* (szczep nr *44*, PZH W-wa) był głównym objektem naszych badań nad zjawiskiem wytwarzania kobalamin przez *C. diphtheriae*.

Poziom kobalin w komórkach *C. diphtheriae* (szczep nr 8) narastał w czasie. Zjawisko to ilustruje tabela II.

Tabela II

Zmiany poziomu kobalamin w czasie hudowli szczepu nr *8*
Changes in cobalamins' amount in culture-medium during growth of strain No. *8*

Czas hodowli (w godz.) Incubation period (in hours)	*pH* pożywki *pH* of the medium	Ilość kobalamin w mg/l 1 hodowli Cobalamins mg per 1 l of culture
24	7,2	0,12
46	7,8	0,90
71	8,0	1,56

Narastanie poziomu kobalamin w czasie hodowli związane było ze zmianami *pH* pożywki. W pierwszej fazie hodowli obserwowano obniżenie *pH* pożywki, później zaś wzrost *pH*, któremu towarzyszyło zwiększenie poziomu kobalamin.

Tabela III

Poziom kobalamin w stosunku do suchej masy bakterii
Production of cobalamins in relation to the dry mass of bacteria cells

Nr badania Experiment No.	Nr szczepu Strain No.	Czas hodowli (w godz.) Incubation-period (in hours)	Sucha masa bakterii g/l pożywki Dry mass of bacteria grams per l of medium	Ilość kobalamin w mg/l pożywki Amount of cobalamins mg per l of medium	mg kobalamin na 1 g suchej masy cobalamins mg per 1 g of bacterial dry mass
69	*8*	36	8,678	1,453	0,16
69a	*8*	62	7,792	1,525	0,19
70	*8*	36	8,365	1,480	0,18
70a	*8*	62	8,258	1,666	0,20
71	*10*	58	6,193	0,460	0,07
71a	*10*	90	6,460	0,490	0,08

Uwaga: W próbach nr 70 i 70 a bakterie hodowano na pożywce doświadczalnej z dodatkiem 15 g peptonu.
In experiments 70 and 70 a bacteria were grown in standard medium with addition of 15 g of peptone.

Poziom kobalamin w odniesieniu do suchej masy bakterii podaje tabela III.

Z tabeli III wynika, że poziom kobalamin w przeliczeniu na 1 g suchej masy nie jest wysoki. Waha się on w granicach od 0,07 do 0,20 mg na 1 g suchej masy. Analogiczne badania wykonane z bakteriami propionowymi wykazały, że stężenie kobalamin w komórkach bakterii dochodzi do 1,6 mg/1 g suchej masy (Zodrow, Pawełkiewicz, dane nie opublikowane).

Dane zawarte w tabeli III wykazują także, że wzbogacenie pożywki doświadczalnej peptonem nie wpłynęło wyraźniej na wzrost suchej masy i na poziom kobalamin. Dodatkowe doświadczenie nad wpływem składu pożywki na poziom kobalamin ujęto w tabeli IV.

Tabela IV

Wpływ pożywki na poziom kobalamin
The effect of medium on the production of cobalamins

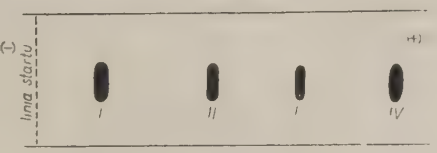
Nr badania Experiment No.	Pożywka Medium	Nr szczepu Strain No.	Sucha masa bakterii w g/l pożywki Dry mass of bacteria, grams per l of medium	Ilość kobalamin w mg/l pożywki Amount of cobalamins mg per l of medium
61	doświadczalna (Standard)	8	6,633	1,01
62	A	8	4,460	0,38
63	B	8	6,206	0,95
64	C	8	6,280	0,74
65	doświadczalna (Standard)	10	4,900	0,41
66	A	10	3,320	0,08
67	B	10	4,980	0,50
68	C	10	1,666	0,06

Pożywka A — jak pożywka doświadczalna, tylko bez hydrolizatu gwasowego kazeiny.
Pożywka B — jak pożywka doświadczalna, tylko z dodatkiem 5 g peptonu.
Pożywka C — jak pożywka doświadczalna, jednak bez ekstraktu drożdżowego.
Medium A — standard medium without acid caseine hydrolysate.
Medium B — standard medium with 5 g of peptone.
Medium C — standard medium without yeast extract.

Dane z tabeli IV wskazują, że pominięcie w pożywce hydrolizatu kwasowego kazeiny lub ekstraktu drożdżowego obniżało poziom kobalamin.

IDENTYFIKACJA KOBALAMIN WYTWARZANYCH PRZEZ *C. DIPHTHERIAE*

Kobalaminy zawarte w koncentratach uzyskanych ze szczepu nr 8 rozdzielano metodą elektroforezy bibułowej wg Holdswortha (Holdsworth, 1953, Pawełkiewicz i Nowakowska, 1955). Jako elektrolit przewodzący stosowano 2 N kwas octowy z dodatkiem 0,015% NaCN. Metodą tą rozdzielano kobalaminy na 4 frakcje. Frakcję elektroobojętną nazwano frakcją I, a frakcje elektrododatnie określono według kolejności ich umiejscawiania się na jonoforogramach jako frakcje II, III i IV (ryc. 1).



Rys. 1. Schemat jonoforogramu kobalamin wyodrębnionych z *C. diphtheriae*
Fig. 1. Ionophorogram of cobalamins isolated from *C. diphtheriae*

Zebrane z szeregu doświadczeń frakcje ponownie poddawano oczyszczeniu jonoforetycznemu. Oczyszczonych frakcji użyto do dalszych badań.

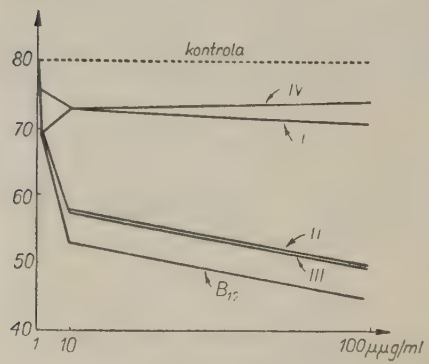
Stwierdzono, że tworzenie czterech frakcji było cechą wspólną dla wszystkich badanych szczepów. Występowanie niektórych frakcji u poszczególnych szczepów nie zawsze było wyraźne. Przyczyną tego mogła być niska wydajność kobalamin. Poza tym stwierdzono, że względne stężenia poszczególnych frakcji zmieniają się w czasie hodowli. To ostatnie zjawisko przebadano szczegółowo na szczepie nr 8 (Pawełkiewicz, Zodrow, 1957).

Wyodrębnione frakcje kobalaminowe identyfikowano metodami fizyko-chemicznymi i mikrobiologicznymi. Na tej drodze udało się zidentyfikować frakcję II i III. Odnośnie do frakcji IV ustalono, że jest ona prawdopodobnie karboksylową pochodną witaminu B_{12p} (czynnika B, korfinoamidu). Frakcja I okazała się mieszaniną co najmniej czterech kobalamin z przewagą dwóch związków. Żadna kobalamina frakcji I nie zawierała ugrupowania nukleotydowego. Posiadały one natomiast jedną dobrze dysocjującą grupę kwasową.

IDENTYFIKACJA FRAKCJI II i III

Już w czasie rozdzielania mieszaniny kobalamin metodą jonoforezy bibułowej obserwowano, że barwa frakcji II i III jest typowa dla nukleotydocyjanokobalamin, a mianowicie czerwonofiołkowa, i nie zmienia się w czasie suszenia jonoforogramu. Badania widmowe uzyskanych frakcji potwierdziły ten wniosek. Oba związki posiadały maksima absorpcji dla fal o długościach 361 i 549-550 mμ, charakterystyczne dla kobalamin zawierających ugrupowanie nukleotydowe. Z położenia obu frakcji na

jonoforogramie oraz z ich właściwości widmowych należało przypuszczać, że frakcja II jest identyczna z adeninocyjanokobalaminą (pseudowitaminem B^{12}), a frakcja III — z 2-metyloadeninocyjanokobalaminą (czynnikiem *A*). Dla potwierdzenia tej hipotezy obie frakcje krystalizowano i krystalicznych preparatów użyto do ostatecznej identyfikacji. Przed krystalizacją koncentraty frakcji II i III oczyszczano dodatkowo chromatograficznie na tlenku glinu eluując obie kobaliny metanolem (J a n i c k i i inni, 1953). Krystaliczne preparaty porównywano bezpośrednio z krystalicznymi preparatami adeninocyjanokobalaminy i 2-metyloadeninocyjanokobalaminy.



Ryc. 2. Aktywność biologiczna frakcji kobalaminowych I-IV *C. diphtheriae* wobec *Euglena gracilis*

Fig. 2. The bilogical activity of four fractions of cobalamins isolated from *C. diphtheriae*. Test strain: *Euglena gracilis*

Na osi odciętych podano stężenie frakcji kobalaminowych w mμg/ml, a na osi rzędnych zaznaczono procent przepuszczalności światła roztworu chlorofilu wyekstrahowanego z komórek *Euglena gracilis* mierzonego na fotokolorymetrze Leitza.

Badania jonoforetyczne i chromatograficzne potwierdziły wysunięte przypuszczenie o identyczności frakcji II z adeninocyjanokobalaminą, a frakcji III z 2-metyloadeninocyjanokobalaminą. Doświadczenia jonoforetyczne przeprowadzano przy *pH* 2,7 w 0,5 N CH_3COOH (H o l d s w o r t h, 1953) i przy *pH* 6,5 (0,05 M bufor fosforanowy z dodatkiem 0,015% NaCN; A r m i t a g e i inni, 1953). Badania chromatograficzne przeprowadzano przy zastosowaniu dwóch rozpuszczalników: 1. nasyconego wodą sek-butanolu z dodatkiem 0,18% trójchlorooctanu sodowego (F r i e d r i c h, G r o s s i B e r n h a u e r, 1956), oraz 2. nasyconego wodą sek-butanolu z dodatkiem 1% (v/v) kwasu octowego i śladów NaCN (K o n, 1955).

Badania aktywności mikrobiologicznej frakcji II i III przeprowadzano z *E. coli* i *Euglena gracilis*. Testy z *E. coli* wykonano metodą krążkową („pad technique"). Krążki z bibuły *Whatman nr 1* o średnicy 10 mm zanurzano do roztworów kobalamin o stężeniach 10, 100 i 250 mμg i suszono. Suche krążki nakładano na pożywkę agarową (H a r r i s o n, L e e s, W o o d, 1951), zaszczepioną kulturą *E. coli*. Po 15 godzinach inkubacji w temperaturze 36° mierzono strefy wzrostu. Oznaczenie przy pomocy *Euglena gracilis* wykonano stosując pożywkę podaną przez H e i n r i c h a i L a h a n n a (1953).

Testy mikrobiologiczne wykazały, że frakcje kobalaminowe II i III posiadają tę samą aktywność wobec *E. coli* co witamin B_{12}, lecz tylko 80% aktywności wobec *Euglena gracilis* (tabela V, rys. 2). Ford i Porter (1953) oraz Coates i Ford (1955) stwierdzają, że aktywność mikrobiologiczna pseudowitaminu B_{12} i czynnika *A* jest taka sama.

Tabela V

Aktywność badanych kobalamin w stosunku do *E. coli 113—3*
Activity of cobalamins for *E. coli 113—3*

Stężenie badanego roztworu w mμg/l ml Concetration of examined solution mμg per 1 ml	Frakcja Fraction	Średnice plam wzrostu w mm Diameter of the growth zone, mm	Wygląd plam wzrostu Kind of growth
10		10,5	
100	I	14,0	dyfuzyjny
250		16,0	diffusive
10		10,2	
100	II	12,0	lity i wyraźny
250		13,5	confluent
10		10,5	
100	III	12,5	lity i wyraźny
250		13,5	confluent
10		10,0	
100	IV	12,0	dyfuzyjny
250		12,5	diffusive
10	Witamin B_{12}	10,5	
100	(kontrola)	12,5	lity i wyraźny
250		13,5	confluent

BADANIE FRAKCJI I i IV

Na podstawie własności elektroforetycznych zaobserwowanych w trakcie rozdzielania kobalamin z *C. diphtheriae*, jak również na podstawie barwy i własności widmowych przypuszczano początkowo, że frakcja IV jest identyczna z witaminem B_{12p} (czynnikiem *B*, deznukleotydocyjanokobalaminą, etiokobalaminą) (Pawełkiewicz, Zodrow, 1956 b). Dalsze badania frakcji IV nie potwierdziły tej hipotezy. Frakcja IV zachowuje się w próbach chromatograficznych inaczej niż witamin B_{12p} i łatwo może być od niego oddzielona. Wartość R_f dla witaminu B_{12p}, B_{12} i frakcji IV wynosiły odpowiednio 0,50, 0,27 i 0,12 (nasycony wodą sek-butanol — 0,18% $Cl_3CCOONa$ + ślady cyjanków) (Friedrich, Gross, Bern-

hauer, 1956). Natomiast frakcja I rozdzielała się w tych warunkach na trzy wyraźne plamy o R_f = 0,15, 0,21 i 0,37, a nadto stwierdzono w ilościach znacznie mniejszych występowanie plam o R_f = 0,03 i 0,09. Ostatnie dwie plamy utrzymywały dość długo po wysuszeniu chromatogramu charakterystyczne fiołkowe zabarwienie form dwucyjanowych kobalamin i tym przypominały opisane przez Pawełkiewicza kobalaminy *y1* i *y2*, wyizolowane z komórek *Propionibacterium shermanii* (Pawełkiewicz, 1956). W kwaśnym rozpuszczalniku (sek-butanol : woda : kwas octowy: NaCN) (Kon, 1955) otrzymywano dla frakcji IV wartość R_f równą 0,27, a dla frakcji I wartości: 0,10, 0,19, 0,24 i 0,34, przy czym kobalaminy o R_f = 0,19 i 0,24 występowały w przewadze. Witamin B_{12} w warunkach doświadczenia dał R_f = 0,19.

Widma absorpcyjne frakcji I i IV były identyczne z widmem witaminu B_{12p}. Wskazuje to na brak nukleotydu w cząsteczkach kobalamin występujących w tych frakcjach.

Badania jonoforetyczne w elektrolicie o *pH* 6,5 w obecności cyjanków (Armitage i inni, 1953) wykazały, że zarówno frakcja kobalaminowa I jak i IV są elektroujemne i wędrują do anody, przy czym plama frakcji IV porusza się nieco szybciej niż frakcji I. Nadto metodą tą wykazano w obu frakcjach obecność niewielkich ilości substancji elektroobojętnych oraz elektroujemnych, poruszających się dwa razy szybciej od plamy głównej.

Z danych powyższych wynika, że frakcja kobalaminowa IV należy prawdopodobnie do tzw. kwasów etiokobalaminokarboksylowych, tj. beznukleotydowych pochodnych kobalamin zawierających wolne grupy karboksylowe. Przy *pH* 2,7 związki te zachowują się elektrododatnio, ponieważ w tych warunkach wolna grupa karboksylowa nie jest zdysocjowana, natomiast wskutek braku nukleotydu dodatni ładunek kobaltu nie jest kompensowany wewnętrznie przez ujemny ładunek kwasu fosforowego. Przy *pH* 6,5 w obecności cyjanków dodatni ładunek kobaltu zobojętniany jest ładunkiem wprowadzonej drugiej grupy cyjanowej (gdyż w warunkach tych tworzy się pochodna dwucyjanowa), a nadto grupa karboksylowa ulega już dysocjacji, co w sumie prowadzi do elektroujemności związku (Dellweg, Becher i Bernhauer, 1956). Związki tego typu spotykali Friedrich, Bernhauer (1953), Bernhauer i Friedrich (1954) w sfermentowanych ściekach miejskich, a Dellweg, Becher i Bernhauer (1956) w produktach rozpadu witaminu B_{12p} (etiokobalaminy) w komórkach *E. coli*. Bernhauer i współpracownicy nazywali je czynnikami *V* lub kwasami etiokobalaminokarboksylowymi. Wykryte we frakcji IV drobne ilości silnie elektroujemnych kobalamin są zapewne kwasami dwukarboksylowymi.

Kobalaminy frakcji I zachowały się przy *pH* 2,7 jak związki elektro-

obojętne. Wskazuje to, że dodatni ładunek kobaltu jest w tych warunkach zobojętniany ujemną grupą silnego kwasu, dysocjującego jeszcze przy tak niskim *pH*. Tym kwasem jest kwas fosforowy. Obecność tego kwasu została wykazana w późniejszych badaniach (Pawełkiewicz, Zodrow, 1957). Przy założeniu, że kobalaminy frakcji I stanowią pochodne fosforowe witaminu B_{12p} łatwo można zrozumieć ich elektroforetyczne zachowanie się również przy *pH* 6,5 w obecności cyjanków. W tych warunkach dołączenie się ujemnej grupy cyjanowej prowadzi do powstania związku elektroujemnego poruszającego się w kierunku anody. Frakcję I stanowią zatem prawdopodobnie różne beznukleotydowe fosforowe estry witaminu B_{12p} (czynnika *B*).

Pod względem aktywności mikrobiologicznej wobec *Euglena gracilis* frakcje I i IV zachowywały się prawie jednakowo. Wykazywały one tylko około 20% aktywności witaminu B^{12} (rys. 2). W badaniach aktywności wobec *E. coli* (tabela V) zarówno frakcja I jak i IV wywoływały strefy wzrostu o charakterystycznym dyfuzyjnym wyglądzie, co jest zjawiskiem typowym dla beznukleotydowych pochodnych kobalaminowych. Podczas gdy frakcja IV wykazywała bardzo słabą aktywność, stymulacja wzrostu *E. coli* pod wpływem frakcji I była bardzo silna.

Wydaje się prawdopodobne, że niska aktywność mikrobiologiczna frakcji I i IV wobec *Euglena gracilis* może być spowodowana obecnością różnych czynnych zanieczyszczeń nie dających się oddzielić metodą elektroforezy bibułowej. Wskazuje na to również bardzo niska aktywność frakcji IV wobec *E. coli*. Karboksylowe pochodne czynnika *B* są według Dellwega, Becher i Bernhauera (1956) nieczynne wobec tego mikroorganizmu.

Serdeczne podziękowanie składamy asystentkom, p. O. Stefaniak i p. H. Zodrow, za Ich sumienną i ofiarną pracę oraz pomoc przy przeprowadzaniu powyższych badań.

Dziękujemy również prof. drowi J. Janickiemu za umożliwienie korzystania ze spektrofotometru oraz prof. drowi H. Meislowi z PZH w Warszawie, dr B. Dobek i dr K. Piątkiewiczowej za łaskawe dostarczenie nam potrzebnych do badań szczepów *C. diphteriae*.

Prof. drowi K. Bernhauerowi (Niemcy) dziękujemy za nadesłanie krystalicznych wzorców adenino- i 2-metyloadeninokobalaminy, a drowi J. J. Pfiffnerowi (St. Zjed.) za preparat pseudowitaminu B_{12}.

Koszta związane z wykonaniem powyższej pracy zostały pokryte z dotacji Komitetu Biochemicznego Wydziału II Polskiej Akademii Nauk.

LITERATURA

Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith L. E., Stafford W. H., Todd A. R., 1953: Chemistry of the vitamin B_{12} group. 3. The course of hydrolytic degradations., *J. Chem. Soc.*, 3849.

Bernhauer K., Friedrich W., 1954: Über die Vitamine der B_{12} — Gruppe. *Angew. Chem.*, **66**: 776.

Clarke W. A., Clarke G. D., 1953: The mechanism of the effect of iron and cobalt on the production of toxin by *Corynebacterium diphteriae*, *Biochem. J.*, **55**: XVI.

Coates M. E., Ford J. E., 1955: Methods of measurment of vitamin B_{12}. *Biochem Soc. Symp.*, **13**: 36.

Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., 1956: Biosynthesen in der Cobalamin-Reihe 2. Die „unspezifischen" Umwandlungsprodukte des Atiocobalamins., *Biochem. Z.*, **328**: 81.

Ford J. E., Porter J. W. G., 1953: Vitamin B_{12}-like compounds 2. Some properties of compounds isolated from bovine gut contents and feaces., *Brit. J. Nutrit.*, **7**: 326.

Friedrich W., Bernhauer K., 1953: Über einen neuen Vitamin B_{12}-Factor. *Angew. Chem.*, **65**: 627.

Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., 1956: Zur chromatographischen Trennung der Vitamine der B_{12}-Gruppe. *Microchimica Acta*: 134.

Harrison E., Lees K. A., Wood F., 1951: The assay of vitamin B_{12} 6. Microbiological estimation with mutant *Escherichia coli* by the plate method, *Analyst*, **76**: 696.

Heinrich H. C., Lahann H., 1953: Die mikrobiologische Bestimmung der B_{12}-Vitamine mit der Grünalge *Euglena gracilis var. bacillaris.*, *Ztschr. Naturforsch.*, **8b**: 589.

Holdsworth E. S., 1953: Differentiation of vitamin B_{12} active compounds by ionophoresis and microbiological assay, *Nature*, **171**: 148.

Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Szebiotko K., Zodrow K., 1953: Otrzymywanie krystalicznej witaminy B_{12} z hodowli promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. *Przemysł Chem.*, **9**: 385.

Kon S. K., 1955: Other factors related to vitamin B_{12}., *Biochem. Soc. Symp.*, **13**. 17.

Pappenheimer A. M., 1947: Diphtheria toxin. III. A reinvestigation of the effect of iron on toxin and porphyrin production. *J. Biol. Chem.*, **167**: 251.

Pawełkiewicz J., 1956: Badania nad biosyntezą związków kobalaminowych. 1. Wyodrębnienie nowych kobalamin z komórek *Prop. shermanii.*, *Acta Biochim. Pol.*, **3**: 581.

Pawełkiewicz J., Nowakowska K., 1955: Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin II. Synteza nowych pochodnych witaminu B_{12}. *Acta Biochim. Pol.*, **2**: 259.

Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1956 a: Wytwarzanie wolnych porfiryn przez *Propionibacterium shermanii.*, *Acta Biochim. Pol.*, **3**: 225.

Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1956 b: The synthesis of cobalamins by *Corynebacterium diphtheriae.*, *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 319.

Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1957: Badania nad biosyntezą związków kobalaminowych. 2. Mechanizm powstawania kobalamin u *Corynebacterium diphtheriae. Acta Biochim. Polon.*, w druku.

Shemin D., Corcoran J. W., Rosenblum C., Miller J. M., 1956: On the biosynthesis of the prophyrinlike moiety of vitamin B_{12}. *Science*, **124**: 272.

Smith L. E., 1956: Biological aspect of vitamin B_{12}. chemistry, 1-sze Europejskie Sympozjum na temat witaminu B_{12} i czynnika wewnętrznego, Hamburg.

J. Pawełkiewicz and *K. Zodrow*

THE SYNTHESIS OF COBALAMINS BY *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Summary

The abbility of the synthesis of cobalamins by 12 strains of *C. diphtheriae* has been investigated. It has been shown that all of the examined strains produced cobalamins. Cobalamins were extracted from bacterial cells.

One strain *C. diphtheriae*, type *gravis*, (strain No 44, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa) produced about 2 mg cobalamins per 1000 ml of medium.

Four fractions: ionophoretically neutral fraction I, and electropositive fractions II, III and IV have been separated by paper electrophoresis from cobalamins extracted from *C. diphtheriae* cells.

It has been shown that fractions II and III are identical with the adeninecyancobalamine (pseudovitamin B_{12}) and 2-methyladeninecyancobalamine (factor *A*), respectively. Both compounds were obtained in crystalline form.

By paper chromatography it has been shown that fraction I contains at least 4 various compounds. Two from them predominated. All cobalamins of the fraction I are probably phosphoric esters of the vitamin B_{12p} (factor *B*).

The ionophoretically fastest-moving fraction IV is probably the carboxylic derivative of the vitamin B_{12p} (factor *B*).

The biological activities of investigated cobalamin fractions relatively to *E. coli* and *Euglena gracilis* have been determined.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 233-238

J. Duda, Z. Pędziwilk i *K. Zodrow*

BADANIA NAD WYSTĘPOWANIEM WITAMINU B_{12} U ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 20 marca 1957 r.

Najwięcej danych dotyczących występowania witaminu B_{12} u roślin podaje Robbins i współpracownicy (1950). Autorzy ci, badając szereg roślin warzywnych, stwierdzili na ogół powszechne występowanie witaminu B_{12} w korzeniach badanych roślin, w mniejszych ilościach znajdowali go w łodygach, a zupełny brak (z wyjątkiem rzodkiewki) w liściach i owocach. Przyjmują oni, że nieznaczne ilości witaminu B_{12} znajdowane u roślin nie są produktem ich własnej biosyntezy, lecz są pochodzenia mikrobiologicznego. Na podstawie stwierdzenia braku wpływu witaminu B_{12} na wzrost korzenia pomidora hodowanego *in vitro* dochodzą do wniosku, że witamin B_{12} nie jest czynnikiem wzrostowym roślin wyższych.

Przyjęcie tezy, nie budzącej w świetle wielu badań żadnej wątpliwości, że zdolność syntezy kobalamin posiadają tylko niektóre drobnoustroje nasunęło przypuszczenie o możliwości powszechniejszego ich występowania u roślin motylkowych, ze względu na ich ścisłą symbiozę z drobnoustrojami. Przypuszczenie to wydaje się tym więcej prawdopodobne, że zgodnie z badaniami Burton i współpracowników (1952) poszczególne szczepy gatunku rodzaju *Rhizobium* hodowane w czystych kulturach wykazują względnie dużą zdolność syntezy kobalamin, sięgającą do 1 γ na 1 ml podłoża. (U wysokowydajnych szczepów promieniowców stężenie witaminu B_{12} sięga 1,1 γ na 1 ml podłoża). Istotnie Lewin i współpracownicy (1954) znaleźli w bulwkach lucerny stosunkowo duże ilości witaminu B_{12} w porównaniu ze śladami tego czynnika występującymi w tkankach innych roślin.

Celem naszych badań było zbadanie występowania witaminu B_{12} u roślin motylkowych i stwierdzenie, czy między roślinami motylkowymi a roślinami niemotylkowymi zachodzą istotne różnice w zawartości tego czynnika.

BADANIA WŁASNE

W badaniach uwzględniono sześć gatunków roślin motylkowych: łubin biały, groch „Victoria", bobik, lucernę siewną, koniczynę czerwoną, komonicę rożkową oraz jako roślinę kontrolną niemotylkową — gorczycę białą. Witamin B_{12} oznaczono w brodawkach, korzeniach oraz liściach roślin w trzech różnych okresach rozwoju roślin. Jednocześnie oznaczono również ilość witaminu B_{12} w glebie pobranej spod badanych roślin. Ponadto przeprowadzono doświadczenie z hodowlą *in vitro* korzeni rośliny motylkowej (łubin) i niemotylkowej (kukurydza) dla oceny witaminu B_{12} jako ewentualnego czynnika wzrostowego roślin wyższych.

DOŚWIADCZENIE I

Materiał roślinny uzyskano z doświadczenia wazonowego, przeprowadzonego w r. 1955 w hali wegetacyjnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu. Każdy gatunek hodowano w pięciu wazonach, w określonych terminach pobierano do badań na obecność witaminu B_{12} wszystkie rośliny z jednego wazonu. Do hodowli roślin użyto gleby piaszczysto-glinianej o zawartości około 3 mg P_2O_5 w 100 g gleby, stosując jako nawożenie 3 g węglanu wapnia, 2,35 g superfosfatu oraz 1,5 g soli potasowej na jeden wazon. Przez cały czas doświadczenia utrzymywano wilgotność gleby na poziomie 60% jej pełnej pojemności wodnej.

Witamin B_{12} oznaczono w brodawkach, korzeniach oraz liściach roślin w trzech okresach rozwoju, w fazie pełnego rozwoju wegetatywnego (termin I), w fazie kwitnienia (termin II) i w fazie po przekwitnieniu rośliny (termin III). Odważone masy brodawek, korzeni i liści, po ich całkowitym oczyszczeniu, rozcierano z piaskiem kwarcowym w moździerzu i mieszano z dwukrotnie destylowaną wodą w stosunku 25 części wody na 1 część świeżej masy roślin. Odczyn zawiesiny ustalono na *pH* 6,0, dodawano cyjanku sodu w ilości 2γ na 1 ml celem uwolnienia wolnego witaminu B_{12} z połączeń kompleksowych, a następnie autoklawowano przez 10 minut przy temperaturze 110°. W tak przygotowanym wyciągu oznaczano witamin B_{12} metodą mikrobiologiczną, stosując jako organizm testowy *Euglena gracilis*. Ilość witaminu oznaczano, określając stężenie acetonowego ekstraktu chlorofilu uzyskanego z kultur glonu. Pomiarów dokonano w kolorymetrze Leitza.

Analogicznie postępowano przy oznaczaniu witaminu B_{12} w glebie, z tą różnicą, że przed autoklawowaniem mieszano ją z wodą w stosunku 1 : 5. Równocześnie oznaczano procent wody w badanych częściach roślin oraz w glebie celem przeliczenia uzyskanych wyników na jednostki suchej masy. Wyniki badań zestawiono w tabeli I.

Tabela I

Ilość witaminu B_{12} w roślinach motylkowych, gorczycy i w glebie
Content of vitamin B_{12} in leguminous plants, in mustard and in soil

Roślina Plant	Termin Stage	Ilość witaminu B_{12} w 1 g suchej masy (w m γ) Vitamin B_{12} m γ per 1 g of dry weight			
		brodawki root-nodules	korzenie roots	liście leaves	gleba soil
Łubin Lupin	I	82,0	16,0	0,5	5,7
	II	81,5	3,7	0,0	3,8
	III	42,0	7,5	0,0	4,9
Groch Been	I	615,0	58,0	0,4	8,1
	II	500,0	10,0	0,0	4,4
	III	960,0	168,0	0,0	4,4
Bobik Horse-been	I	947,0	12,5	0,0	6,8
	II	316,0	5,0	0,0	4,3
	III	874,0	17,0	0,0	4,5
Koniczyna Clover	I	369,0	5,1	0,0	4,4
	II	518,0	14,7	0,0	4,1
	III	128,0	11,9	0,0	5,2
Komonica Birds' trifoil	I	297,0	12,0	0,0	12,7
	II	19,0	4,0	0,0	4,6
	III	71,0	11,0	0,0	7,8
Lucerna Alfalfa	I	435,0	1,2	0,0	4,6
	II	230,0	3,2	0,0	4,4
	III	—	2,7	0,0	6,1
Gorczyca Mustard	I	—	9,9	0,3	5,9
	II	—	1,9	0,0	4,5
	III	—	1,1	0,0	5,0

* „—" nie badano — not examined

DOŚWIADCZENIE II

Celem stwierdzenia, czy istotnie witamin B_{12} jest czynnikiem obojętnym dla wzrostu korzeni, oraz stwierdzenia, o ile czynnik ten może przenikać z podłoża do tkanek roślinnych, przeprowadzono doświadczenie nad hodowlą *in vitro* korzeni łubinu i kukurydzy. Jako podłoża do hodowli korzeni użyto pożywki Robbinsa zmodyfikowanej dodatkiem śladowych ilości kobaltu. Skład pożywki był następujący: na 1000 ml wody 2 × destylowanej dodano 20 g sacharozy, 0,333 g $Ca(NO_3)_2$, 0,040 g $MgSO_4$,

0,063 g KNO_3, 0,042 g KCl, 0,060 g KH_2PO_4, 0,0025 g $Fe_2(SO_4)_3$, 0,0001 g $ZnSO_4$, 0,0001 g H_3BO_3, 0,0005 g $CoCl_2$, 0,0002 g witaminu B_1 i 0,0002 g witaminu B_6. Hodowlę korzeni prowadzono w probówkach ze szkła jenajskiego na 20 ml pożywki zestalonej dodatkiem 0,8% agaru. W każdej kombinacji było 5 powtórzeń.

Każdą probówkę szczepiono jednym stożkiem korzenia o długości 3 mm. Stożki te uzyskano przez odcięcie końca korzenia z jałowo wykiełkowanych nasion (długości korzenia około 3 cm). Hodowlę prowadzono przez 14 dni w termostacie przy temperaturze 28°. Po skończonej hodowli wyrośnięte korzenie wyjmowano ze słupka agarowego, mierzono długość korzenia głównego, oznaczano świeżą masę korzeni w całej serii, a z kolei, postępując analogicznie jak w doświadczeniu poprzednim, oznaczano ilość witaminu B_{12} w masie korzeni. Wyniki doświadczenia przedstawiono w tabeli II.

Tabela II

Wpływ witaminu B_{12} na wzrost korzeni
Influence of vitamin B_{12} on the growth of plant-roots

Roślina Plant	Ilość dodanego w m γ witaminu B_{12} (na 1 ml) Amount of added vitamin B_{12} (m γ per 1 ml)	Średnia długość korzeni w cm The average lenght of the roots (cm)	Świeża masa korzeni w g The weight of the roots (g)	Ilość witaminu B_{12} w 1 g świeżej masy korzeni w m γ Vitamin B_{12} per 1 g of the root, m γ
Kukurydza Maize	0	15,8	0,268	0,0
	0,1	17,5	0,275	—
	1,0	14,6	0,248	1,17
	10,0	14,8	0,276	3,01
Łubin Lupin	0,	4,3	0,418	0,0
	0,1	5,1	0,432	0,23
	1,0	5,8	0,401	3,12
	10,0	5,9	0,426	16,19

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki doświadczenia I wykazały, że witamin B_{12} u roślin motylkowych występuje głównie w brodawkach, w mniejszej ilości w korzeniach, natomiast w masie zielonej rośliny czynnika tego prawie zupełnie nie znajdujemy. Stosunkowo wysoki poziom witaminu B_{12} w brodawkach tłumaczyć można zdolnością bakterii brodawkowych do biosyntezy tego czynnika. Znaczne różnice u poszczególnych roślin wynikały prawdo-

podobnie z różnej intensywności wytwarzania tego czynnika przez poszczególne gatunki bakterii brodawkowych. Fakt ten jest zgodny z obserwacjami Burton i współpracowników (1952). Ilość witaminu B_{12} w korzeniach jest znacznie mniejsza, nie przekraczając stężenia B_{12} znalezionego w glebie oraz w korzeniach rośliny niemotylkowej. Większe odchylenia w niektórych próbach były prawdopodobnie spowodowane niedostatecznym oczyszczeniem korzeni z brodawek. Wyniki otrzymane wskazują na to, że obecność witaminu w korzeniach należałoby tłumaczyć nie dyfuzją z brodawek, lecz pobieraniem go przez korzenie roślin razem ze składnikami pokarmowymi z gleby. W zielonych częściach roślin motylkowych podobnie jak u roślin niemotylkowych witamin B_{12} nie występował. Roślin tych nie można zatem uważać za ewentualne źródło czynnika APF w żywieniu zwierząt.

W doświadczeniu II przeprowadzono dowód, że witamin B_{12} nie wywiera wpływu na wzrost korzeni zarówno rośliny niemotylkowej jak i motylkowej. Stężenie witaminu B_{12} w korzeniach wahało się mniej więcej na tym samym poziomie co stężenie w glebie. Fakt ten świadczy o balastowym charakterze witaminu B_{12} znajdującego się w korzeniach roślin.

Oznaczanie witaminu B_{12} w masie roślinnej w trzech różnych okresach ich rozwoju nie wykazało żadnych istotnych różnic.

LITERATURA

Burton M. O. and Lochhead A. G. 1952: Production of vitamin B_{12} by *Rhizobium* species. *Can. J. Botany*, **30**: 521.

Levin A. P., Tendler H. B. and Moses D., 1954: Vitamin B_{12}, *Rhizobia* and leguminous plants, *Science*, **120**: 734.

Robbins W. J., Hervey A. and Stebbins M. E., 1950: Studies on *Euglena* and vitamin B_{12}. *Bull. Torrey Botan. Club.*, **77**: 423.

J. Duda, Z. Pędziwilk, K. Zodrow

STUDIES ON THE VITAMIN B_{12} CONTENT OF THE LEGUMINOUS PLANTS

Summary

The vitamin B_{12} content of six species of leguminous plants (*Lupinus angustifolius, Medicago sativa, Trifolium pratense, Lotus corniculatus, Pisum sativum, Vicia faba minor*) and of *Sinapis alba* was determined by mean of *Euglena* method. The samples of nodules, roots and leaves were taken during three periods od growth of the plants: from young plants, in the phase of flowerage, and some days (7 to 10 days) after the flowerage.

The authors have shown that:

1. The vitamin B_{12} content was the greatest in the nodules. The content of vitamin B_{12} in the roots was much lower than in the nodules. There was no vitamin B_{12} in the leaves (table I).

2. There were great differences in the vitamin B_{12} content between different species of leguminous plants.

3. The vitamin B_{12} content of the leguminous plants did not significantly differ during the different periods of growth.

Additional experiments, with roots of *Lupinus luteus* and of *Zea mays* growing *in vitro*, were made. The experiments have shown that:

1. The vitamin B_{12} is not a growth factor for the roots.

2. The level of the vitamin B_{12} in the roots growing *in vitro* is similar to the level of the vitamin B_{12} in the medium (table II).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 239-251

H. Kaszubiak, E. Malińska i *Z. Pędziwilk*

BADANIA NAD WYTWARZANIEM I SKŁADEM KOBALAMIN U *RHIZOBIUM MELILOTI*

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu

Wpłynęło dnia 10 kwietnia 1957 r.

Zdolność syntezy witaminów grupy B_{12} jest szeroko rozpowszechniona wśród różnych grup drobnoustrojów. Pierwsze organizmy wytwarzające witamin B_{12} wyizolowano z odchodów kurcząt (Stokstad i inni, 1948), z kału bydlęcego (Petty i Matrishin, 1949) i z gleby (Mc Ginnis i inni, 1949). Liczba poznanych już dziś mikroorganizmów syntetyzujących ten witamin sięga kilku tysięcy. Należą do nich bakterie, promieniowce, grzyby (Hall i Tsuchiya, 1951) oraz jak ostatnio stwierdzono — *Chlorella vulgaris* i *Anabaena cylindrica* (Brown i inni 1956).

Burton i Lochhead (1951) stwierdzili, że z 676 badanych przez nich szczepów promieniowców 66,6% produkowało witamin B_{12}. Janicki i współpracownicy (1954) podają, że aż 86% promieniowców glebowych wykazuje zdolność syntezy witaminu B_{12}.

Występowanie witaminu B_{12} w tkankach roślin wyższych i w tkankach zwierzęcych jest zjawiskiem wtórnym. Rośliny pobierają prawdopodobnie witaminy tej grupy z roztworów glebowych lub bezpośrednio od współżyjących z nimi mikroorganizmów. Na ogół stwierdza się większe ilości witaminu B_{12} w korzeniach niż w łodygach, a zupełny jego brak lub znikome ilości w liściach roślin (Robbins i inni 1950, Duda i inni 1957).

Dość duże ilości witaminów grupy B_{12} znaleziono w bulwkach roślin motylkowych (Duda i inni 1957).

Burton i Lochhead (1952), Levin i inni (1954) oraz Vyas i Prasad (1956) stwierdzili, że bakterie z rodzaju *Rhizobium* syntetyzują stosunkowo duże ilości witaminów grupy B_{12}. W badaniach Burton i Lochheada (1952) przeprowadzonych na 70 szczepach z 6 gatunków *Rhizobium* stwierdzono najwyższą zawartość kobalamin w komórkach *Rhizobium meliloti*. Wszystkie badane szczepy tego gatunku

produkowały ponad 100 mγ witaminów grupy B_{12} na 1 ml hodowli, przy czym jeden z nich wytwarzał aż 1055 mγ na 1 ml hodowli.

W skład naturalnych witaminów grupy B_{12} poza 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminą (witamin B_{12}), będącą ciałem czynnym dla organizmów zwierzęcych, wchodzi cały szereg kobalamin czynnych tylko w stosunku do mikroorganizmów, różniących się między sobą budową chemiczną i aktywnością biologiczną.

W dotychczasowych badaniach nad bakteriami z rodzaju *Rhizobium* oznaczano mikrobiologicznie ogólną aktywność kobalamin posługując się mało specyficznym organizmem testowym *Lactobacillus leichmannii*, z wyjątkiem L e v i n a, który posłużył się metodą *Euglena gracilis* i *Ochromonas malhammensis*. W badaniach tych nie przeprowadzano więc identyfikacji kobalamin.

Autorzy niniejszej pracy badali zdolność wytwarzania witaminów grupy B_{12} przez *Rhizobium meliloti*. Wyodrębnione przez ekstrakcję kobalaminy rozdzielano przy pomocy elektroforezy. Poszczególne frakcje kobalamin identyfikowano chromatograficznie i mikrobiologicznie.

IZOLACJA SZCZEPÓW *RHIZOBIUM MELILOTI*

Z jednorocznej lucerny przed kwitnieniem pobrano do izolacji zdrowe, różowe brodawki. Brodawki obmywano w bieżącej wodzie, usuwano przylegające grudki gleby i zanurzano na 5 minut w 0,1% roztworze $HgCl_2$, następnie przenoszono na parę minut do 95% etanolu, po czym opalano lekko w płomieniu i przemywano jałową wodą. Z wyjałowionych powierzchniowo w ten sposób brodawek przeszczepiano bakterie na pożywkę o składzie: Mannitol 1%, K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,02%, NaCl — 0,01%, $CaCO_3$ — 0,3%, woda drożdżowa (10% roztwór) 100 ml, agar 1,5%.

Posiewu dokonywano kilkoma sposobami: a) przez pobranie materiału z brodawki igłą preparacyjną i nakłuwanie pożywki, b) przez przykładanie do powierzchni pożywki połówek rozciętych brodawek, c) przez zakażenie pożywki masą zmiażdżonych brodawek. Pierwszy sposób okazał się najpewniejszy.

Po 24-48-godzinnej inkubacji w 28° badano mikroskopowo czystość kultury, a następnie izolowano pojedyncze kolonie na pożywce Smith-Leonarda (L e o n a r d, 1931, F r e d i inni, 1932).

Uzyskiwane kolonie były drobne, błyszczące, soczewkowato wypukłe, okrągłe i całkowicie zabarwione fioletem krystalicznym. Tak wyizolowane kolonie bakterii brodawkowych przeszczepiano na podłoża diagnostyczne oraz wymienione już podłoże mannitolowe, na którym szczepy przechowywano. Zastosowano następujące podłoża diagnostyczne: pod-

łoże Clarka i Lubsa (H o f e r 1941), podłoże Sagena (S a g e n 1934), oraz opisane już podłoże mannitolowe z dodatkiem błękitu bromotymolowego (A l l e n 1953).

Wszystkie wyizolowane szczepy dały śladowe zmętnienie w pożywkach Clarka i Sagena, zakwaszały po 6 dniach podłoże mannitolowe, słabo redukowały azotany do azotynów. Na podłożu mannitolowym wykazywały konsystencję mniej śluzowatą niż na podłożu Thorntona z sacharozą (T h o r n t o n i G a n g u l e e, 1926). Preparat mikroskopowy bakterii z pożywki mannitolowej wykazywał także mniejsze ilości substancji śluzowych. Na podłożu płynnym w hodowli trzęsawkowej wyizolowane komórki *Rhizobium meliloti* były znacznie krótsze i grubsze.

DOBÓR PODŁOŻA I WARUNKI HODOWLI

Do hodowli szczepów próbowano zastosować pożywkę płynną wykonaną wg B u r t o n (1952) zastępując ekstrakt drożdżowy i kwaśny hydrolizat kazeiny (preparaty „Difco") analogicznymi preparatami otrzymanymi w naszej pracowni. Rozwój bakterii był jednak bardzo słaby prawdopodobnie na skutek gorszej jakości tych odczynników. Próbowano wzbogacić pożywkę $MnSO_4$ i $CaCl_2$ w ilościach stosowanych w innych pożywkach dla *Rhizobium*. Nie uzyskano w ten sposób lepszych wyników.

Opierając się na dotychczasowych spostrzeżeniach różnych autorów, że stosunkowo najlepszym podłożem dla rozwoju bakterii brodawkowych jest wyciąg z roślin motylkowych, wykonano pożywkę o *pH* 7,5 oraz składzie:

K_2HPO_4	0,1%
$MgSO_4$	0,02%
NaCl	0,1%
$CaCl_2$	0,01%
$MnSO_4$	0,001%
$FeSO_4$	0,001%
$CoCl_2$	0,0008%
wyciąg z lucerny	50%
glikoza	1%

Wyciąg z lucerny otrzymywano przez zalanie 50 g zmielonych, zielnych części lucerny 1 l wody destylowanej i gotowanie przez 30 min. w aparacie Kocha. Następnie wyciąg sączono i uzupełniano wodą destylowaną do 1 l. Pożywkę i 10-procentowy roztwór cukru jałowiono oddzielnie w aparacie Kocha. Do jałowej pożywki dodawano jałową glikozę.

Po wstępnych próbach pokonania trudności związanych z hodowlą

Rhizobium meliloti ustalono następujący tok postępowania, który zabezpieczał stosunkowo dużą wydajność masy bakteryjnej w hodowli:

a) Uzyskanie kultury agarowej

Skosy agarowe z pożywką mannitolową zaszczepiano badanymi szczepami *Rhizobium*. Po 48 godzinach hodowli kulturę powierzchniową zmywano 5 ml roztworu soli fizjologicznej. Uzyskaną zawiesiną posłużono się do hodowli wstępnej („kultura matka") celem zaadaptowania szczepów do warunków hodowli płynnej.

b) Hodowla wstępna

Pożywki o składzie podanym wyżej rozlewano w ilości po 200 ml do kolb 1000 ml i szczepiono 1 ml zawiesiny uzyskanej ze skosu agarowego. Hodowlę wstępną prowadzono przez 48 godzin w termostacie trzęsawkowym przy 28° ustalając wielkość przesuwu na 10 cm i szybkość na 80 pełnych wychyleń na minutę.

c) Hodowla właściwa

200 ml pożywki w litrowych kolbach, o składzie jak wyżej, szczepiono 0,5 ml kultury wstępnej. Hodowlę prowadzono w ciągu 6 dni w tych samych warunkach co hodowlę wstępną.

W poszukiwaniu pożywki dającej lepszy wzrost bakterii zastosowano następujące jej modyfikacje:

A. dodanie 100 ml 10-procentowej wody drożdżowej na 1 l pożywki,

B. zastąpienie glikozy glicerolem w celu zmniejszenia ilości śluzu w hodowli,

C. zastąpienie glikozy glicerolem i dodanie 100 ml 10-procentowej wody drożdżowej na 1 litr pożywki.

Pożywki szczepiono bezpośrednio zawiesiną z pożywki stałej, hodowano na trzęsawce 4 dni i próbowano odwirować. Najlepsze wyniki otrzymano przy zastosowaniu pożywki *C*.

Następne doświadczenie przeprowadzono na pożywce *C* i na pożywce *C* wzbogaconej 200 ml 10-procentowej wody drożdżowej (C_1) stosując szczep nr *3*. Oznaczano przy tym masę komórek bakterii oraz poziom witaminu B_{12} w poszczególnych pożywkach metodą podaną niżej. Ponieważ duże ilości śluzu występujące w hodowlach nie pozwalały na bezpośrednie oznaczenie suchej masy, masę komórek w hodowli bakterii określano przez oznaczenie azotu całkowitego, opierając się na badaniach F r e d a (1932) stwierdzających stałą procentową zawartość azotu w komórkach *Rhizobium*. Masa komórek bakterii wynosiła na pożywce *C* — 184,5 mg N na 1 l hodowli, na pożywce C_1 — 191 mg N na 1 l hodowli.

W przeciwieństwie do zbliżonych zawartości azotu wydajność witaminu B_{12} w kulturze bakterii hodowanych na pożywce *C* i C_1 wykazywała znaczne różnice. W pierwszym wypadku uzyskano 0,097 mg B_{12} na 1 l

pożywki, natomiast w drugim wypadku otrzymano wartość prawie dwa razy większą — 0,173 mg na 1 l pożywki.

Na podstawie uzyskanych wyników stosowano w dalszych badaniach pożywkę C_1.

METODY EKSTRAKCJI I ROZDZIAŁU KOBALAMIN

Kobalaminy można było wyodrębniać bezpośrednio z hodowli lub z odwirowanej masy bakteryjnej. Przy próbie uzyskania kobalamin z pełnej hodowli stosowano następującą metodę: do hodowli dodawano 0,015% NaCN, doprowadzano *pH* do 6 lub 6,5 i ogrzewano w autoklawie przez 15 minut w 110°. Po ochłodzeniu hodowlę zakwaszano do *pH* 5,2 - 5,3 dla łatwiejszego odwirowania osadu bakteryjnego. Odwirowany, przemyty osad odrzucano, a połączone klarowne płyny znad osadu alkalizowano do *pH* 7 i adsorbowano substancje czynne na węglu aktywnym (Carbopol H_2, Janicki i inni, 1953). Węgiel dodawano w ilości 0,01%. Po kilku godzinach wytrząsania węgiel odsączano, przemywano wodą i eluowano kobalaminy 75% acetonem (Janicki i inni, 1953). Z eluatu aceton odparowywano. Z pozostałego roztworu wodnego ekstrahowano i oczyszczano kobalaminy metodą Pawełkiewicza i Zodrowa (niepublikowane).

Przy uwalnianiu kobalamin z odwirowanej i przemytej masy bakterii postępowano następująco. Hodowlę wirowano, osad bakteryjny dwukrotnie przemywano wodą i zadawano wodą w ilości 100-300 ml na 1 l hodowli, po czym dodawano 0,015% NaCN, doprowadzano *pH* do 6-6,5 i ogrzewano w autoklawie przez 15 minut w 110°. Niezależnie od metody ekstrakcji kobalamin z komórek przeprowadzano dalsze ich oczyszczanie wspomnianą metodą Pawełkiewicza i Zodrowa. W tym celu osad odwirowano i jednokrotnie przemywano wodą. Połączone płyny ekstrahowano wielokrotnie (8-12 razy) mieszaniną chloroformu i fenolu (1 : 1). Zebrany ekstrakt fenolowy oddzielano przez wirowanie od resztek fazy wodnej i wytrącającego się w czasie ekstrakcji osadu, rozcieńczano chloroformem i butanolem w stosunku 1 : 1 : 1, a następnie reekstrahowano kilkakrotnie kobalaminy małymi ilościami wody. Pozostałości fenolu usuwano z roztworu wodnego przez trzykrotne przemycie chloroformem. Dla lepszego oczyszczenia preparatu ekstrahowano kobalaminy z frakcji wodnej mieszaniną chloroformu i krezolu (1 : 1), rozcieńczano chloroformem i butanolem, reekstrahowano wodą i przemywano chloroformem jak poprzednio. Otrzymany roztwór wodny kobalamin przepuszczano przez kolumnę z tlenkiem glinu i odparowywano do sucha na łaźni wodnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Tlenek glinu sporządzano według Janickiego, Pawełkiewicza i innych (1953). Wyekstrahowane powyższą metodą kobalaminy rozpuszczano w określonej objętości wody

i oznaczano ilościowo na spektrofotometrze marki Unicam typ SP-500, według Janickiego i współpracowników (1956).

Absorpcję mierzono dla fali 550 mμ wobec wody jako roztworu porównawczego. W pożywce oprócz witaminu B_{12} (maksimum absorpcji 550 mμ) znajdowały się tylko nieznaczne ślady tzw. czynników *A* i *B*, które posiadają inne maksima absorbcji. Dlatego oznaczone tą metodą stężenie przyjmowano za stężenie witaminu B_{12}.

Wyekstrahowane kobalaminy rozdzielano elektroforetycznie w środowisku kwaśnym. W tym celu suchą pozostałość wyekstrahowanych i oczyszczonych na kolumnie glinowej kobalamin rozpuszczano w małej objętości wody, nanoszono na bibułę chromatograficzną *Whatman nr 3* i po wysuszeniu rozdzielano elektroforetycznie metodą Holdswortha (Holdsworth, 1953).

Identyfikację kobalamin przeprowadzano także metodą elektroforezy przy *pH* 6,5. Kobalaminy nanoszono na bibułę jak poprzednio. Jako rozpuszczalnika używano 0,05 M Na_2HPO_4 z dodatkiem 0,015% NaCN. Roztwór alkalizowano ługiem do *pH* 6,5 (Armitage i inni, 1953). Dla utrzymania niezmienionego odczynu w czasie rozdziału elektroforetycznego wymieniano rozpuszczalnik.

Dalszą identyfikację przeprowadzano metodami chromatograficznymi. Po wysuszeniu otrzymanego metodą Holdswortha elektroforogramu wycinano poszczególne pasy, cięto na drobne skrawki i eluowano 3-6 razy w odstępach jednogodzinnych małymi ilościami wody. Rozdzielone frakcje odparowywano do sucha na łaźni wodnej pod zmniejszonym ciśnieniem, poddawano powtórnej elektroforezie w środowisku kwaśnym, eluowano i odparowywano jak wyżej. Tak oczyszczone frakcje nanoszono na bibułę chromatograficzną *Whatman nr 1*. Stosowano chromatografię wstępującą pasmową i krążkową. Jako rozwijacza używano układu sek-butanol-trójchlorooctan sodu-cyjanek potasu-woda (Friedrich i inni, 1955, 1956). Sporządzano go jak następuje: drugorzędowy butanol wysycano wodą, dodawano 0,01% KCN i 0,2% trójchlorooctanu sodu.

MIKROBIOLOGICZNE OZNACZANIE KOBALAMIN WYTWORZONYCH PRZEZ SZCZEPY *RHIZOBIUM MELILOTI*

W dotychczasowych badaniach nad wytwarzaniem kobalamin przez bakterie brodawkowe stosowano szczep *Lactobacillus leichmannii*, który reaguje także na deznukleotydocyjanokobalaminę (tzw. czynnik *B*) oraz na dezoksyrybozydy. W niniejszych badaniach wyizolowane szczepy przebadano na wytwarzanie witaminów grupy B_{12}, oznaczając kolorymetrycznie zawartość chlorofilu w komórkach *Euglena gracilis var. bacillaris* hodowanej na pożywce Heinricha (Heinrich, Lahann 1953).

Dla otrzymania masy komórkowej hodowano 16 szczepów na pożywce podanej wyżej w kolbkach 300 ml, zawierających 75 ml pożywki. Jak poprzednio stosowano hodowlę wstępną. Pożywkę właściwą szczepiono 0,2 ml 2-dniowej hodowli wstępnej. Po 6 dniach inkubacji na trzęsawce oznaczano zawartość azotu ogólnego w odwirowanych komórkach mikrometodą Kjeldahla. Równocześnie dla poszczególnych szczepów wykonano oznaczenie zawartości kobalamin metodą *Euglena gracilis* (tabela I).

Jak wynika z tabeli, nie stwierdzono zależności pomiędzy masą komórek bakterii a ilością wytworzonych kobalamin.

Ilość wydzielonego śluzu była u badanych szczepów różna.

Tabela I

Zawartość witaminu B_{12} i azotu ogólnego
The content of vitamin B_{12} and of total N in *Rhizobium meliloti*

Nr szczepu Strain No.	W 1 litrze hodowli w mg mg per 1 l of culture fluid		Ilość B_{12} w γ na 100 mg N Amount of B_{12} γ per 100 mg of N total
	B_{12}	N ogólny N total	
1	0,124	203,81	60,84
2	0,090	234,64	38,35
3	0,118	170,52	69,20
4	0,165	290,01	56,89
5	0,140	191,46	73,12
6	0,085	271,55	31,30
7	0,030	250,46	11,98
8	0,055	208,88	26,33
9	0,145	244,85	59,21
10	0,075	218,01	34,40
11	0,035	328,53	10,65
12	0,004	60,62	6,60
13	0,032	76,38	41,89
14	0,040	187,18	2,14
15	0,017	150,26	11,58
16	0,050	191,46	2,87

IDENTYFIKACJA KOBALAMIN U *RHIZOBIUM MELILOTI*

Rozdział i identyfikację kobalamin otrzymanych z hodowli *Rhizobium meliloti nr* 3 próbowano przeprowadzić w odwirowanej masie komórek bakteryjnych. Napotykano jednak na duże trudności przy ich oddzielaniu nawet przy 5-krotnym odwirowywaniu na wirówce Sharplessa przy 40 000 obrotów. Z tego względu ekstrahowano je bezpośrednio z hodowli, jednak w tym wypadku kobalaminy zawierały zanieczyszczenia substancji barwy żółtej, maskującej ich obecność. Pomimo częściowego ich oznacze

nia na kolumnie z tlenkiem glinu. elektroforogramy i chromatogramy wykazywały jeszcze znaczne ilości tych zanieczyszczeń, występujących w postaci żółtej, ciągnącej się smugi zaciemniającej uzyskiwany obraz.

W dalszych badaniach dzięki zastosowaniu podłoża hodowlanego C_1 podanego na stronie 136 uzyskiwano przez odwirowanie całkowite oddzielenie komórek od podłoża. Pozwoliło to na ekstrakcję kobalamin z komórek bakterii, przy czym ekstrakty zawierały minimalne zanieczyszczenia. Wyekstrahowane kobalaminy rozdzielano elektroforetycznie metodą Holdswortha porównując ich szybkość jonoforetyczną z szybkością następujących kobalamin: krystalicznej 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminy (witamin B_{12}), adeninocyjanokobalaminy (pseudowitamin B_{12}), 2-metyloadeninocyjanokobalaminy (tzw. czynnik *A*) oraz elektroforetycznie i chromatograficznie jednorodnej deznukleotydocyjanokobalaminy (tzw. czynnik *B*). Kobalaminy wyodrębnione z komórek *Rhizobium meliloti* rozdzielały się elektroforetycznie na 3 pasma: jedno pasmo elektroobojętne i dwa pasma elektrododatnie. Jedno z nich posiadało szybkość jonoferotyczną odpowiadającą 2-metyloadeninocyjanokobalaminie. Drugie przybierające w atmosferze cyjanków barwę fioletową, przesuwało się z szybkością jonoforetyczną czynnika *B*. Kobalaminy elektrododatnie występowały w ilościach śladowych, tak że pasma ich były dobrze widoczne dopiero po przeprowadzeniu ich w kompleksy dwucyjanowe. Kobalamina o prędkości jonoforetycznej równej czynnikowi *B* w warunkach elektroforezy przy *pH* 6,5 zachowywała się elektroobojętnie, co świadczy o jej tożsamości z czynnikiem *B*. Kobalamina ta nie pojawiała się po dodaniu do trzydniowej hodowli 5,6-dwumetylobenzimidazolu jako prekursora

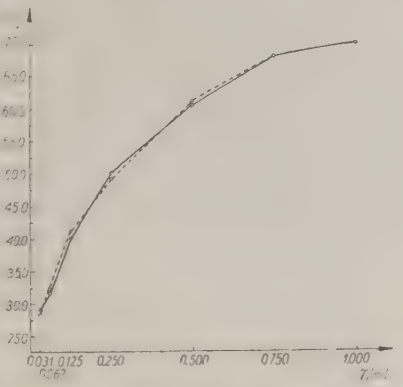
Tabela II

Mikrobiologiczna aktywność kobalamin wyodrębnionych z *Rhizobium meliloti*
The microbiological activity of cobalamins obtained from *Rhizobium meliloti*

Wyodrębnione kobalaminy Isolated cobalamins	*E. coli*	*Euglena gracilis*	*Ochromonas malhammensis*
5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalamina	++	++	++
2-metyloadeninocyjanokobalamina	++	+	O
deznukleotydocyjanokobalamina	++*	O	O

++ wzrost silny — growth strong
+ wzrost średni — growth medium
O wzrost równy wzrostowi na pożywce bezwitaminowej — growth slight
* wzrost dyfuzyjny — growth diffusive

(2 mg 5,6-dwumetylobenzimidazolu na 1 l podłoża). Takie same rezultaty dla czynnika *B* uzyskał w badaniach nad *Propionibacterium shermanii* Pawełkiewicz (1954) oraz nad *Corynebacterium diphtheriae* Pawełkiewicz i Zodrow (1957). Ze względu na śladowe ilości tej kobalaminy nie stwierdzono przyrostu frakcji elektroobojętnej. Stosując chromatografię bibułową wstępującą, pasmową i krążkową, stwierdzono, że w granicach błędu współczynnik R_f kobalaminy elektroobojętnej jest taki sam jak R_f krystalicznego witaminu B_{12}, R_f zaś kobalamin elektrododatnich o prędkościach jonoforetycznych równych czynnikom *A* i *B* jest taki jak R_f krystalicznego czynnika *A* oraz elektroforetycznie i chromatograficznie jednorodnego czynnika *B*. Przy oznaczeniu współczynnika R_f poszczególne frakcje kobalamin były chromatograficznie jednorodne.



Rys. 1. Wpływ krystalicznego witaminu B_{12} i witaminu B_{12} wyodrębnionego z *Rhizobium meliloti* na wzrost *E. coli*
Fig. 1. The effect of crystalline vitamin B_{12} and of vitamin B_{12} isolated from *Rhizobium meliloti*, on the growth of *E. coli*

———— Witamin B_{12} krystaliczny
Cristalline vitamin B_{12}
- - - - - - - Witamin B_{12} wyodrębniony z *Rhizobium* — Vitamin B_{12} isolated from *Rhizobium*

Poza identyfikacją chemiczną przeprowadzono identyfikację mikrobiologiczną. Badano aktywność poszczególnych czynników: a) w stosunku do mutanta *E. coli* — metodą płytkową (Harrison i inni, 1951, Boguckа i inni 1953), b) *Euglena gracilis* — na podłożu Heinricha (Heinrich, Lahann, 1953), c) *Ochromonas malhammensis* (Ford 1953). Wyniki przedstawiono w tabeli II.

Mikrobiologiczna aktywność poszczególnych, zidentyfikowanych chemicznie kobalamin wyodrębnionych z *Rhizobium meliloti* jest równa aktywności odpowiednich krystalicznych kobalamin.

Bernhauer i Friedrich (1954), Brown i współpracownicy (1955) wyodrębnili poza witaminem B_{12} wiele innych kobalamin elektroobojętnych, z których $B_{12}III$ i czynnik *F* pobudza znacznie słabiej niż witamin B_{12} wzrost *Ochromonas malhammensis*. Silny wzrost *Ochromonas malhammensis* w obecności małych stężeń kobalaminy elektroobojętnej wyodrębnionej z *Rhizobium meliloti* wskazuje na tożsamość tej kobalaminy z witaminem B_{12}.

Niezależnie od tego porównano wpływ poszczególnych stężeń krystalicznego witaminu B_{12} oraz wpływ odpowiednich stężeń witaminu B_{12} wyodrębnionego z *Rhizobium meliloti* na *E. coli*. Na wykresie (rys. 1) przedstawiono graficzną zależność między stężeniami kobalaminy a wagą sfotografowanych i wyciętych z papieru fotograficznego stref wzrostu *E. coli mutans*. (Fantes i O'Callaghan 1955).

Jak widać z wykresu krzywe wzrostu *E. coli* w obecności krystalicznego witaminu B_{12} i kobalaminy elektroobojętnej wyodrębnionej z *Rhizobium meliloti* przebiegają identycznie.

Reasumując uzyskane wyniki stwierdzono występowanie w komórkach *Rhizobium meliloti* trzech kobalamin:

1) elektroobojętnej, o chemicznych i biologicznych właściwościach 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminy (witamin B_{12}),

2) elektrododatniej, odpowiadającej deznukleotydocyjanokobalaminie (tzw. czynnik *B*),

3) elektrododatniej, odpowiadającej 2-metyloadeninocyjanokobalaminie (tzw. czynnik *A*).

* * *

1. Z brodawek lucerny wyizolowano 16 szczepów *Rhizobium meliloti*, które przebadano na wytwarzanie kobalamin metodą *Euglena gracilis*. W zależności od szczepu uzyskiwano wydajności od 0,004 do 0,165 mg B_{12} na 1 l hodowli.

2. Stwierdzono u poszczególnych szczepów brak korelacji pomiędzy zawartością azotu całkowitego a ilością kobalamin w komórkach.

3. Zauważono, że glikoza i sacharoza wpływają na wytworzenie większej ilości śluzu u *Rhizobium meliloti* niż alkohole wielowodorotlenowe (glicerol, mannitol).

4. Zwiększenie ilości wody drożdżowej w podłożu wpływa dodatnio na poziom kobalamin u *Rhizobium meliloti*.

5. Przeprowadzono rozdział i identyfikację kobalamin wytwarzanych przez 1 szczep *Rhizobium meliloti*. Metodami chemicznymi i mikrobiologicznymi stwierdzono wytwarzanie 3 kobalamin: witaminu B_{12}, tzw. czynnika *A* i tzw. czynnika *B*. Kobalaminy elektrododatnie występowały w ilościach śladowych.

Składamy serdeczne podziękowanie Kierownikowi Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu, doc. drowi Józefowi Dudzie za stworzenie warunków do wykonywania tej pracy i cenne uwagi, oraz Kierownikowi Zakładu Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu, doc. drowi Jerzemu Pawełkiewiczowi za okazaną pomoc i zainteresowanie pracą.

LITERATURA

Allen O. N., 1953: Experiments in Soil Bacteriology. II, Burgess Publishing Co., Minneapolis.

Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Lester Smith E., Stafford Witt a. Todd A. R., 1955: Chemistry of the vitamin B_{12} group. III. The course of hydrolitic degradations. *J. Chem. Soc.*, 3849.

Bernhauer K., Friedrich W., 1954: Über die Vitamine der B_{12} Gruppe. *Angew. Chemie* **66**: 776.

Bogucka I., Iwanowska J., Kękoł H. 1953 Zastosowanie *E. coli* do oznaczania B_{12} w ekstraktach wątrobowych, *Przem. Chem.* **9**: 512.

Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., a. Smith L. E., 1955: The vitamins B_{12} group. Presence of 2-methyl purines in factor A and H and isolation of new factors. *Biochem. J.*, **59**: 82.

Brown F., Cuthbertson W. F. J., a Fogg G. E., 1956: Vitamin B_{12}. Activity of *Chlorella vulgaris* Beij. and *Anabaena cylindrica* Lemm., *Nature*, **177**: 188.

Burton M. O. a. Lochhead A. G., 1951: Studies on the production of B_{12}-active substances by microorganisms, *Canad. J. Bot.*, **29**: 352.

Burton M. O. a. Lochhead A. G., 1952: Production of Vitamin B_{12} by *Rhizobium sp., Canad J. Bot.*, **30**: 521.

Duda J., Pędziwilk Z. i Zdrow K. 1957: Badania nad wytwarzaniem witaminu B_{12} u roślin motylkowych. *Acta Microbiol. Polon.* **6**: 233.

Fantes K. H. a. O'Callaghan C. H., 1955: The effect of phenylenediamine on the biosynthesis of vitamin B_{12}, *Biochem. J.*, **59**: 79.

Ford J. E., 1953: The microbiological assay of vitamin B_{12}. The specifity of the requirement of *Ochromonas malhammensis* for cyanocobalamin., *Brit. J. Nutrit.*, **7**: 299.

Fred E. B., Baldwin K. a. Mc Coy E., 1932: Root nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin Studies in Science **5**: 343.

Friedrich W., Bernhauer K., 1955: *Z. Naturforsch.* **10b**, 6. za Armitage *et al.* 1955.

Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., 1956: Zur chromatographischen Trennung der Vitamine B_{12} Gruppe., *Microchim. Acta*: 134.

Mc Ginnis J., Stephenson E. L., Levadie B. T. W. a. Carver J. S., 1949: Response of chicks and turkey poults to vitamin B_{12} supplements produced by fermentation with different organisms. Abst. of papers. Amer. Chem. Soc. 116th meeting 42 A.

Hall H. H. a. Tsuchiya H. M., 1951: Method for producing vitamin B_{12} *U. S. Patent*: **2**, 561.364.

Harrison E. Lees K. A., a. Wood F., 1951: The assay of vitamin B_{12} 6. Microbiological estimation with mutant *Escherichia coli* by the plate method. *Analyst.* **75**: 696.

Hofer A. W., 1941: *J. Bact.* **45**: 39 (wg Allen 1953).

Holdsworth E. S., 1953: Differentiation of vitamin B_{12} active compounds by ionophoresis and microbiological assay. *Nature*, **171**: 148.

Heinrich H. C., Lahann H., 1953: Die mikrobiologische Bestimmung der B_{12} Vitamine mit der Grünalge *Euglena gracilis* (*var. bacillaris.*) *Z. Naturforsch.* **8b**: 10,549.

Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki S., Szebiotko K., Zo-

drow K., 1953: Otrzymywanie krystalicznej witaminy B_{12} z hodowli promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. *Przem. Chem.*, **9**: 385.

Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki S. Zodrow K., 1954: Wytwarzanie witaminu B_{12} przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces*. *Acta Microbiol. Polon.* **3**: 3.

Janicki J., Pawełkiewicz J., Nowakowska K., 1956: Otrzymywanie koncentratów oraz krystalicznego witaminu B_{12} ze ścieków miejskich poddanych fermentacji metanowej. *Acta Biochim. Polon.* **3**: 161.

Leonard L., 1931: *J. Bact.*, **21**: 35, (wg. Allen 1953).

Levin A. P., Funk H. B., Tendler M. D., 1954: Vitamin B_{12}, Rhizobia and leguminous plant. *Science* **120**: 784.

Pawełkiewicz J., 1954: Prekursory biosyntezy witaminu grupy B_{12}. Synteza nowego witaminu z grupy B_{12}: 5(6)-metylbenzimidazolocyjanokobalaminy. *Acta Biochim. Polon.* **1**: 30.

Pawełkiewicz J., Nowakowska K., 1955: Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. II. Synteza nowych pochodnych witaminu B_{12}. *Acta Biochim. Polon.* **2**: 259.

Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1957. Wytwarzanie kobalamin przez *Corynebacterium diphtheriae*. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 219.

Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1957: Badanie nad biosyntezą związków kobalaminowych. 2, Mechanizm powstawania kobalamin u *Corynebacterium diphtheriae*., *Acta Biochim. Polon.* 4: w druku.

Petty M. A. a. Matrishin M., 1949: Fermentation for production of the animal protein factor., *Bact. Proc.*; 47.

Robbins W. J., Hervey A. a. Stebbins M. E., 1950: Studies on *Euglena* and vitamin B_{12}. *Bull. Torrey Bot. Club.* **77**: 423.

Sagen L., 1934: J. Bact., **28**: 571 (wg Allen 1953).

Stokstad E. L. R., Page A., Pierce J., Franklin A. L., Jukes T. H., Heinle R. W., Epstein M. a. Welch A. D., 1948: Activity of microbial animal protein factor concentrates in pernicious anemia., *J. Lab. Clin. Med.* **33**: 860.

Thornton H. G. a. Gangulee N., 1926: The life cycle of the nodule organisms *Bacillus radicicola* (Beij.) in soil and its relation to the infection of the host plant., *Proc. Roy. Soc.* ser. *B*, **20**: 99.

Vyas S. R., Prasad N., 1956: Production of vitamin B_{12} by Rhizobia in Gujarat soil. *J. Sci. Ind. Res.* (B-C) **15**: 52.

H. Kaszubiak, E. Malińska and *Z. Pędziwilk*

STUDIES ON THE PRODUCTION AND STRUCTURE OF COBALAMINS IN *RHIZOBIUM MELILOTI*

Summary

1. 16 strains of *Rh. meliloti*, isolated from root nodules of alfalfa, were examined. The production of cobalamins was measured by biological method with *Euglena gracilis* as a test organism. The yield of cobalamins varied from strain to strain (0,004 — 0,165 mg of vitamin B_{12} per 1000 ml of culture-fluid).

2. No correlation was found between the amount of total nitrogen and the concentration of cobalamins in bacterial cells.

3. The production of cobalamins was stimulated by the yeast-extract in medium.

4. The cobalamins produced by one of tested strains were examined by chemical and biological methods. Three various compounds were found: vitamin B_{12}, factor *A* and *B*. Only traces of electrophoretically positive cobalamins were found.

5. It was shown that the slime production in *Rh. meliloti* was greatly enhanced by glucose or saccharose. Much less slime was produced in media containing polyhydroxyalcohols (glicerol, mannitol).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 253-268

J. Duda i *H. Kaszubiak*

BADANIA NAD WPŁYWEM PODŁOŻA NA AKTYWNOŚĆ ANTYBIOTYCZNĄ PROMIENIOWCÓW GLEBOWYCH

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 22 maja 1957 r.

Problemowi antybiotyków poświęcono w ostatnich kilkunastu latach wyjątkowo wiele uwagi i badań. O kierunku badań decydowały cele praktyczne związane z powszechnym stosowaniem antybiotyków w lecznictwie. Dlatego też w problemie antybiozy dominują aż do tej chwili takie kierunki badań, jak poszukiwania drobnoustrojów wykazujących właściwości antybiotyczne, badania zależności między warunkami hodowli a wydajnością antybiotyków, badania budowy chemicznej antybiotyków, specyficzności i wybiórczości ich działania, a ponadto rozległe badania nad działaniem klinicznym antybiotyków.

Nieopracowaną natomiast dziedziną jest problem roli drobnoustrojów antybiotycznych w naturalnych biocenozach, gdzie stosunki antagonistyczne są ważnym i niezmiernie interesującym zjawiskiem ekologicznym. Wnioskowanie o roli antybiozy w glebie na podstawie znajomości zachowania się drobnoustrojów glebowych w czystych kulturach, oraz na ustalonych laboratoryjnych pożywkach, budzi jednak poważne wątpliwości. Wątpliwości te potwierdzają wyniki licznych badań związanych z opracowaniem metod oznaczania aktywności antybiotycznej drobnoustrojów w zależności od warunków hodowli i podłoża.

La Page i Campell (1945), Rake i Donovick (1946), Rao, Rao i Ventkataraman (1946), Ainsworth i inni (1947), oraz Dulaney (1948) stosując nieorganiczne jak i organiczne źródła azotu otrzymywali znaczne różnice w wydajności streptomycyny. Woodruf i Ruger (1945) badając wpływ miedzi i żelaza na wzrost grzybni i wytwarzanie streptomycyny przez *Streptomyces griseus* stwierdzili, że wydajność hodowli nie zależy od masy grzybni. Wpływ podłoża na wytwarzanie aureomycyny przez *Str. aureofaciens* przebadali między innymi:

Perlman (1950), Duggar i inni (1952), Johnson (1952). Waksman (1947) wykazał, że spośród około 200 szczepów promieniowców glebowych hodowanych na bulionie z agarem tylko 15% działało hamująco na wzrost *B. subtilis*, podczas gdy przy zastosowaniu podłoża z glikozą i aspariginą procent ten wzrósł do 45. Według Plotho (1940) podłoże bulionowe i podłoże z glicerolem oraz glikokolem powodują wzrost aktywności antybiotycznej promieniowców glebowych, przy czym korzystniejsze jest pod tym względem według Strutza (1954), podłoże drugie. Lindner i Walhäuser (1955) stwierdzili zależność pomiędzy temperaturą hodowli a zdolnością wytwarzania antybiotyków przez promieniowce na różnych pożywkach. Badany przez nich szczep wykazywał na podłożu bulionowym większą aktywność antybiotyczną w temperaturze 37° niż w 25°. Na podłożu z wyciągiem drożdżowym stosunki te układały się odwrotnie.

Duży wpływ na wytwarzanie antybiotyków ma fizyczny stan podłoża. Spośród przebadanych przez Waksmana promieniowców wykazujących właściwości antybiotyczne w hodowlach agarowych tylko 10% zachowało je w hodowlach na podłożu płynnym (za Kuryłowiczem i Ślopkiem, 1950).

Przeprowadzono również liczne badania nad wpływem substancji wzrostowych jak: tiamina, laktoflawina, kwas para-aminobenzoesowy, kwas askorbinowy i inne (Di Raimondo i Ortali, 1948) na wrażliwość mikroorganizmów na antybiotyki. Stwierdzono, że niektóre z ciał czynnych wzmagają wrażliwość, inne natomiast ją obniżają. Inni badacze (Waksman i Schatz 1945) stwierdzili znaczne osłabienie działania streptomycyny przy zwiększeniu zawartości w podłożu fosforanów i cukrów, a Green (1947) zauważył to samo zjawisko przy wzroście stężenia licznych kwasów organicznych, jak pirogronowego, fumarowego, bursztynowego, jabłkowego i innych. Treffers (1946) zwiększenie wrażliwości drobnoustrojów wyjaśniał obecnością inaktywatorów enzymów bakteryjnych, a Paine i Clark (1954) przypuszczają, że jednym z czynników wywołujących zmiany w oporności drobnoustrojów na streptomycynę może być przestawienie się poszczególnych drobnoustrojów na utlenianie różnych źródeł węgla.

Z przeglądu ważniejszych danych z literatury wynika zatem, że ocena badanych drobnoustrojów pod względem ich zdolności do wytwarzania antybiotyków jest zagadnieniem niezmiernie trudnym. Trudność ta tkwi przede wszystkim w istnieniu wielu nieznanych czynników w różny sposób wpływających na ostateczny wynik, który charakteryzuje właściwości antybiotyczne drobnoustrojów.

W pracy niniejszej zwrócono uwagę na korelację między efektem antybiotycznym kilku szczepów promieniowców a składem kilku pożywek

stosowanych w badaniach nad mikroorganizmami glebowymi. Ponadto porównano dwie różne metody wykrywania i określania aktywności zjawiska antybiozy. W części drugiej pracy przedstawiono wyniki doświadczenia nad zmianami w zespołach mikroflory trzech typów gleb na skutek wprowadzania do nich dużej dawki silnie antybiotycznego szczepu *Str. griseus 3496* (szczep waksmanowski).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

IZOLACJA ANTYBIOTYCZNYCH SZCZEPÓW PROMIENIOWCÓW GLEBOWYCH

Promieniowce izolowano z gleby piaszczysto-gliniastej pól doświadczalnych WSR w Poznaniu-Sołaczu. Z próbek gleby sporządzono zawiesinę wodną w rozcieńczeniu 1 : 100 000. Jeden ml zawiesiny wylewano na płytki Petriego i mieszano z 15 ml pożywki o składzie: sacharoza 2 g, K_2HPO_4 0.5 g, NH_4NO_3 1 g, wyciąg glebowy 200 ml, agar 20 g, woda wodociągowa ad 1 l. Odczyn pożywki ustalono na *pH* 7 - 7.2.

Sporządzenie wyciągu glebowego: 1 kg ziemi ogrodowej zalewano 1 litrem wody wodociągowej i zostawiano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, następnie wyjaławiano przez 30 minut w temperaturze 110°, sączono przez watę, pozostały osad odwirowywano, a klarowny płyn znad osadu ponownie wyjaławiano.

Po upływie 3-5 dni hodowli w temperaturze 28° promieniowce izolowano z płytek na skośną pożywkę agarową, przygotowaną na wyciągu ziemniaczanym. Przynależność izolowanych szczepów do rodzaju *Streptomyces* określano, opierając się na klasyfikacji Waksmana i Henriciego (1943).

Hodowlę na agarze skośnym prowadzono przez 5-10 dni w temperaturze 28°, aż do uzyskania obfitego zarodnikowania. Następnie według zmodyfikowanej metody Willistona i innych (1947) badano aktywność antybiotyczną wyizolowanych szczepów w stosunku do bakterii testowych: *Sarcina lutea, Staphylococcus aureus H-Oxford, Bacillus subtilis ATCC 6633* i *Escherichia coli*. W tym celu na pożywkę ziemniaczaną rozlaną w ilości po 20 ml do płytek Petriego posiewano rysowo wzdłuż średnicy płytki zawiesinę zarodników promieniowców sporządzoną przez spłukanie kultury przy pomocy 3 ml 0.85% NaCl. Po trzydniowej hodowli w temperaturze 28° doszczepiano zawiesiny wyżej wymienionych szczepów bakterii testowych prostopadle do linii posiewu promieniowców. Zawiesiny sporządzano z 24-godzinnej kultury (w temperaturze 28°) na pożywce o składzie: pepton — 0,6%, pankreatyczny hydrolizat kazeiny — 0,4%, wyciąg drożdżowy — 0,3%, wyciąg wołowy — 0,15%, glikoza — 0,1%, agar — 1,5%. Odczyn pożywki — *pH* 6,5. Płytki inkubowano przez

24 godziny w temperaturze 28°. po czym mierzono strefy zahamowania wzrostu.

Na 56 wyizolowanych szczepów, 35 wykazywało aktywność antybiotyczną w stosunku do gramdodatnich bakterii testowych, a spośród nich 24 także w stosunku do *E. coli*. Również Waksman (1945) podaje, że antagonistyczne działanie promieniowców w stosunku do gramujemnych bakterii spotyka się rzadziej niż działanie na organizmy gramdodatnie.

W badaniach nad wpływem podłoża na zdolność antybiotyczną promieniowców posłużono się silnie antybiotycznym waksmanowskim szcze-

Tabela I

Niektóre morfologiczne i fizjologiczne cechy wyizolowanych promieniowców z rodzaju *Streptomyces*

Morphological and physiological characteristics of *Streptomyces* strains isolated from soil

Zbadane cechy Characteristics	Nr szczepu Strain No.		
	5	38	56
Barwa grzybni na podłożu asparaginowym po 14 dniach hodowli w 28° Colour of pseudomycelium	miąższ kremowy zarodniki różowo-czerwone	miąższ brunatno-fioletowy zarodniki brunatne	miąższ mleczno-kawowy zarodniki białe
Pigment rozpuszczalny w podłożu (podłoże asparaginowe) Soluble pigment	—	barwa fioletowa	
Barwiki melaninowe na bulionie z żelatyną po 14 dniach Melanine pigments	+	+	+
Hydroliza skrobi po 6 dniach Hydrolysis of starch	+	+	+
Hemoliza po 3 dniach Haemolysis	—	+	+
Peptonizacja mleka po 4 dniach Peptonisation of milk			
Redukcja NO_3 na NO_2 po 14 dniach Reduction of NO_3 to NO_2			
Upłynnienie żelatyny po 14 dniach Liquefation of gelatine	—	—	—

pem *Str. griseus 3496* oraz trzema własnymi szczepami (*nr 5, 38* i *56*), wyizolowanymi z gleby, które na podłożu ziemniaczanym wykazały silną aktywność antybiotyczną w stosunku do użytych szczepów bakterii testowych. Szczepy promieniowców po inkubacji na podłożu asparaginowym (według Borensztajna i Wolfa, 1955) przechowywano w temperaturze +4°.

Bliższą charakterystykę własnych szczepów wyizolowanych z gleby podajemy w tabeli I.

BADANIE NAD WPŁYWEM PODŁOŻA NA ZDOLNOŚĆ ANTYBIOTYCZNĄ PROMIENIOWCÓW GLEBOWYCH

Aktywność antybiotyczną wyizolowanych szczepów promieniowców badano na 2 modyfikacjach podłoża Pridhama i Gottlieba (1948) oraz na modyfikacjach pożywki według Gräfa (za Paszkiewicz, 1955). Skład pożywek był następujący:

Pożywka *nr 1*:	K_2HPO_4	— 0.5 g
	$MgSO_4$	— 1 g
	$CaSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0.0064 g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0.0011 g
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	— 0.0079 g
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0.0015 g
	glikoza 10%	— 100 ml
	wyciąg wołowy	— 200 ml
	agar	— 15 g
	woda dest.	— ad 1 l

Pożywka *nr 2*: Skład jak pożywka *nr 1*. Zamiast wyciągu wołowego — 1 g pankreatycznego hydrolizatu kazeiny.

Pożywki nr *3a* i *3b*:	glikoza 10%	— 100 ml
	K_2HPO_4	— 1 g
	wyciąg glebowy	— 800 ml
	agar	— 15 g
	woda dest.	— ad 1 l

Pożywka *4a* i *4b* różniły się od pożywek *3a* i *3b* dodatkiem azotu amonowego. Zamiast K_2HPO_4 dodawano $(NH_4)_2HPO_4$ w ilości odpowiadającej równoważnikowi fosforowemu.

Pożywki *5a* i *5b* posiadały skład pożywek *3a* i *3b*, z dodatkiem 200 ml wyciągu wołowego na 1 l pożywki.

Pożywki *6a* i *6b* skład jak pożywki *3a* i *3b*, dodatek 1 g pankreatycznego hydrolizatu kazeiny na 1 l pożywki.

Do pożywek oznaczonych numerami *3a*, *4a*, *5a* i *6a* używano wyciągu z gleby ogrodowej, do pożywek *3b*, *4b*, *5b* i *6b* używano wyciągu piaszczystej gleby ornej. Oba rodzaje wyciągów glebowych sporządzano w sposób podany wyżej. Odczyn wszystkich wymienionych pożywek ustalono na *pH* 7,2.

Dla oceny wartości użytych pożywek przeprowadzono następujące doświadczenie:

50 ml pożywki w kolbach o pojemności 300 ml zaszczepiono promieniowcami. Przez 5 dni prowadzono hodowlę głębinową w termostacie trzęsawkowym przy temperaturze 28°. Następnie pseudogrzybnię odwirowano i przemyto oraz oznaczono jej suchą masę. Średnie wyniki z trzech powtórzeń zestawiono w tabeli II.

Tabela II

Wpływ podłoża na masę grzybni wyizolowanych promieniowców glebowych
Effect of culture medium on the growth of *Streptomyces* strains

Nr szczepu Strain No.	Sucha masa pseudogrzybni w mg/1 l hodowli na podłożach: Dry weight of pseudomycelium, mg per 1 l of culture fluid					
	1	2	3a	4a	5a	6a
5	1280	1773	1147	3790	947	2253
38	600	867	267	1233	1000	900
56	1447	1607	367	887	1220	687
Str. griseus	760	867	307	687	1533	1390

Wyniki doświadczenia wskazują, że najmniej odpowiednia była pożywka nr *3a* (wyciąg glebowy wzbogacony dodatkiem fosforu i glikozy). Inne podłoża wykazały natomiast znacznie silniejszy wzrost, szczególnie te, które wzbogacono dodatkiem azotu amonowego oraz pankreatycznego hydrolizatu kazeiny. Niemniej charakterystyczny jest fakt, że poszczególne szczepy badanych promieniowców zachowały się bardzo różnie na tych samych podłożach. Wskazuje to na trudności związane z doborem optymalnych pożywek dla promieniowców glebowych.

Dalszy tok postępowania przy wykonaniu doświadczenia nad aktywnością antybiotyczną był następujący:

Badane szczepy promieniowców hodowano na agarze skośnym z pożywką asparaginową przez 14 dni w temperaturze 28°. Następnie zarodniki spłukiwano 3 ml 0,85-procentowego NaCl i 1 ml tej zawiesiny szczepiono powierzchniowo podłoże sporulacyjne. Jako podłoża sporulacyjnego użyto pożywki agarowo-ziemniaczanej, rozlewanej jałowo po 50 ml do kolb stożkowych o pojemności 300 ml. Po 10 dniach hodowli w temperaturze 28° zarodniki zbierano na sucho jałowymi perełkami szklanymi, zawieszano w 10 ml 0,85% NaCl i wytrząsano aż do uzyskania równomiernej zawiesiny. Tak sporządzoną zawiesinę posiewano rysą wzdłuż średnicy na płytkach Petriego w pięciu powtórzeniach dla każdej kombinacji. Dalszy tok postępowania był taki sam, jak przy izolacji antybiotycznych szczepów. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli III.

Tabela III

Wpływ składu podłoża na aktywność antybiotyczną przebadanych promieniowców z rodzaju *Streptomyces*

Effect of the culture medium on antibiotic activity of *Streptomyces* strains

Szczep Nr Strain No.	Testowe mikroorganizmy Test bacteria	Średnie strefy zahamowania wzrostu (w mm) na podłożach: Inhibition zones in mm on various media										Stopień reakcji Degree of activity
		1	2	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	
nr 5	*S. lutea*	12	18	19	18	15	2	6	4	0	2	0—2
	S. aureus	5	6	16	14	10	2	2	0	0	2	0—2
	B. subtilis	12	16	12	15	14	2	2	0	0	2	0—2
	E. coli	4	3	14	15	3	0	0	0	0	0	0—2
nr 38	*S. lutea*	27	30	30	28	29	34	29	24	30	35	3
	S. aureus	26	24	24	27	27	31	24	23	23	25	3
	B. subtilis	24	29	29	27	28	32	27	26	28	28	3
	E. coli	5	7	7	7	13	18	5	5	12	12	1—1
nr 56	*S. lutea*	26	25	29	25	29	27	28	29	28	28	3
	S. aureus	16	18	17	15	15	15	17	20	17	18	2
	B. subtilis	17	17	16	8	16	17	17	17	14	15	1—2
	E. coli	10	9	4	6	3	4	6	8	6	6	1
Str. griseus	*S. lutea*	21	19	16	16	13	14	13	19	15	17	2—3
	S. aureus	23	16	5	6	0	0	15	16	5	6	0—2
	B. subtilis	22	16	4	4	0	0	14	13	7	3	0—3
	E. coli	20	15	0	0	0	0	10	10	0	0	0—2
Stopień reakcji antybiotycznej Degree of activity		1—3	1—3	0—3	0—3	0—3	0—3	0—3	0—3	0—3	0—3	

Objaśnienie: 3 — reakcja silnie antybiotyczna (strefy zahamowania ponad 20 mm)
2 — reakcja średnio antybiotyczna (strefy zahamowania od 10—20 mm)
1 — reakcja słabo antybiotyczna (strefy zahamowania od 1—5 mm)
0 — brak reakcji antybiotycznej.
3 — strong antibiotic activity (inhibition zone > 20 mm diameter)
2 — inhibition zone — 10—20 mm diameter
1 — inhibition zone — 1—5 mm diameter
0 — no antibiotic action.

Uzyskane wyniki wskazują na zależność aktywności antybiotycznej badanych szczepów od pożywki. Wszystkie szczepy promieniowców działały hamująco na wszystkie badane bakterie tylko na pożywkach *nr 1* i *2*. Na pozostałych pożywkach stwierdzono często zupełny brak działania. Zjawiska tego nie można tłumaczyć różną wartością pożywek jako

podłoża wzrostowego. Świadczy o tym fakt, że na najmniej przydatnych do hodowli pożywkach wahania aktywności antybiotycznej były takie same, jak na podłożach dających największy przyrost masy.

Szczepy *38* i *56* odznaczały się na ogół stałą i wysoką aktywnością antybiotyczną, niezależnie od składu i wartości pożywki. Znacznie słabsze działanie na *E. coli* tłumaczyć należy mniejszą wrażliwością użytego szczepu testowego. Natomiast pozostałe dwa szczepy promieniowców zachowały się bardzo różnie na różnych podłożach, niekiedy nie działając zupełnie na bakterie testowe. Opierając się na powyższych spostrzeżeniach, można by, wprowadzając większą ilość pożywek oraz większą ilość szczepów bakterii testowych, ustalać stopień ustalenia (wierności) „cechy antybiotyczności" badanych szczepów.

W doświadczeniu naszym szczepy *nr 38* oraz *56* posiadały wyższy stopień ustalenia cechy antybiotyczności, aniżeli szczep *nr 5* oraz szczep *Streptomyces griseus nr 3496.*

Jak wynika z tabeli IV, najbardziej wrażliwym szczepem w naszym doświadczeniu był szczep *S. lutea*, najmniej wrażliwy natomiast *E. coli.* Szczep *S. aureus* oraz *B. subtilis* były jednakowo wrażliwe, jednak bardziej oporne niż *S. lutea.*

Tabela IV

Wrażliwość bakterii testowych na szczepy promieniowców antybiotycznych
Sensitivity of tested bacteria to antibiotic action of streptomyces

Szczep Strain	Reakcje w procentach — Degree of sensitivity				
	silne high	średnie medium	słabe slightly	oporne resistant	razem total
S. lutea	52	35	10	3	100
S. aureus	28	37	25	10	100
B. subtilis	28	42	20	10	100
E. coli	0	20	52	28	100

W celu zbadania przydatności metody probówkowej seryjnych rozcieńczeń (Kuryłowicz, Ślopek, 1950) dla oznaczania aktywności antybiotycznej promieniowców oraz porównania tej metody z zastosowaną metodą rysową przeprowadzono następujące doświadczenie:

Przesącze z hodowli promieniowców (z poprzedniego doświadczenia — tabela II) filtrowano jałowo a następnie dodawano do pożywki bulionowej zaszczepionej *B. subtilis ATCC 6633.* Stosowano rozcieńczenia 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, 1 : 512. Kultury probówkowe po dodaniu przesączów inkubowano w termostacie przy tem-

peraturze 37°. Po 24 godzinach stwierdzano stan hodowli notując graniczne rozcieńczenie działające bakteriostatycznie. Wyniki doświadczenia zestawiono w tabeli V.

Tabela V

Aktywność bakteriostatyczna przesączów hodowli promieniowców w stosunku do *B. subtilis ATCC 6633*
Bacteriostatic activity of filtrates of streptomyces culture against *B. subtilis ATCC 6633*

Szczep Nr Strain No.	Graniczne rozcieńczenie bakteriostatyczne pożywki Active dilution of filtrates culture media					
	1	2	3a	4a	5a	6a
5	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	1:256	1:128
56	0	0	0	0	0	0
Str. griseus 3496	1:128	1:8	0	0	0	0

Dane z tabeli V wykazują, że tą metodą stwierdzono tylko 4 dodatnie reakcje na 24 możliwych, podczas gdy metodą rysową ilość reakcji dodatnich znalezionych na pożywkach zestalonych wynosiła 21. Wynika z tego, że metoda seryjnych rozcieńczeń probówkowych jest mniej przydatna zarówno do wykrywania własności antybiotycznych badanych promieniowców, jak i do określania ich aktywności antybiotycznych.

DOŚWIADCZENIE Z WSIEWANIEM *STR. GRISEUS* DO GLEBY

W doświadczeniu tym badano wpływ szczepu *Str. griseus* na mikroflorę 3 typów gleb: torfu z torfowiska niskiego, gleby ogrodowej i piaszczystej gleby leśnej.

Charakterystykę gleboznawczą gleb uwzględnionych w doświadczeniu zestawiono w tabeli VI.

Doświadczenie przeprowadzono następująco: Z pobranych powietrzno-suchych próbek przesianych przez sito o oczkach ⌀ 3 mm, odważono 60 próbek po 25 g do kolb stożkowych o pojemności 100 ml. Do 30 kolb z glebą każdego rodzaju dodawano zawiesiny zarodników *Str. griseus* w ilości $30{,}7 \times 10^6$ komórek na 1 g powietrzno-suchej gleby. Zawiesinę zarodników uzyskiwano w sposób podany przez nas na początku pracy. Następnie doprowadzano wilgotność wszystkich prób do 60% pełnej pojemności wodnej. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°. Ubytek wody uzupełniano co 5 dni jałową wodą. W poszczególnych terminach

Tabela VI

Charakterystyka gleb
Characteristics of tested soils

Rodzaj gleby Kind of soil	Kwasowość		Zawartość związków organicznych w suchej masie Organic substances in dry mass %	Pojemność wodna Water capacity %	Woda hygroskopowa Water hygroscopic %
	czynna	wymienna			
	Acidity				
	active	exchange			
Torfowa Peaty	7,5	7,0	47,82	79,67	10,15
Ogrodowa Garden-soil	7,3	6,7	18,51	54,82	1,92
Leśna Forest-soil	5,5	4,0	3,1	23,62	0,49

Tabela VII

Wpływ *Str. griseus 3496* na ogólną ilość bakterii i promieniowców w glebie
Influence of *Str. griseus 3496* on the total number of bacteria and actinomycetes in soil

Typ gleby Kind of soil	Rodzaj próby Experiment	Grupa mikroorganizmów Microorganisms	Ilość mikroorganizmów w tys./1 g powietrzno-suchej gleby po upływie dni... Number of microorganisms (thousands per 1 g of soil) after... days of incubation							
			0	2,5	6	10	17	34	99	125
Torfowa Peaty soil	kontrola control	*B*	2320	77361	76916	64152	59428	57318	54811	29935
		P	340	327	6926	4078	3034	4822	3674	4397
	+ *Str. griseus*	*B*	2320	113726	80481	46656	44615	21560	49717	27801
		P	340	60361	110808	41698	23932	21957	8456	4113
Ogrodowa Garden-soil	kontrola control	*B*	5400	68311	25251	14353	9054	6040	3296	3350
		P	2140	114.9	6379	5050	3392	4162	3811	2436
	+ *Str. griseus*	*B*	5400	42794	15948	8771	5422	4414	2525	2766
		P	2140	41467	36415	33225	12626	8831	5183	2410
Leśna Forest soil	kontrola control	*B*	738	15964	1273	—	388	366	376	319
		P	1163	3311	1027	—	1414	1331	1222	567
	+ *Str. griseus*	*B*	732	15727	1201	—	363	301	294	301
		P	1163	21184	16125	—	18774	10816	1416	568

B — bakterie, bacteria
P — promieniowce, *Streptomyces*

zdejmowano z każdej kombinacji 3 kolbki, glebę z nich łączono i mieszano, a następnie pobierano 10 g jako próbki reprezentacyjne do ilościowej analizy na bakterie i promieniowce. Przy przygotowaniu zawiesiny do posiewów płytkowych stosowano metodę homogenizacji próbki glebowej według D u d y i współpracowników (1957). Do posiewów użyto pożywki o składzie: pepton — 1 g, sacharoza — 1 g, K_2HPO_4 — 1 g, $MgSO_4$ — 0,3 g, NaCl — 0,3 g, agar — 20 g, woda wodociągowa — ad 1 litr.

Kolonie liczono po 3 dniach (w temperaturze 28°). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli VII.

Celem przeprowadzenia dokładniejszej analizy wyników doświadczenia wyliczono stosunki liczbowe między bakteriami i promieniowcami na podstawie wykazanych cyfr (tabela VIII).

T a b e l a VIII

Stosunek ilości bakterii do ilości promieniowców
Number of bacteria to number of Streptomyces

Typ gleby Kind of soil	Rodzaj próby Experiment	Stosunek bakterii do promieniowców po dniach Number of bacteria — Number of Streptomyces after days of incubation			
		0	2,5	10	125
Torfowa	kontrolna	6,9 : 1	244 : 1	15 : 1	6,8 : 1
Peaty soil	doszczepiana inoculated	6,9 : 1	1,9 : 1	1,1 : 1	6,8 : 1
Ogrodowa	kontrolna	2,6 : 1	6 : 1	2,8 : 1	1,2 : 1
Garden soil	doszczepiana inoculated	2,6 : 1	1 : 1	3 : 1	1,1 : 1
Leśna	kontrolna	0,6 : 1	4,8 : 1	1,2 : 1	0,6 : 1
Forest soil	doszczepiana inoculated	0,6 : 1	0,7 : 1	0,08 : 1	0,5 : 1

Śledząc kształtowanie się bezwzględnych ilości obu grup drobnoustrojów oraz stosunków między nimi w obu kombinacjach w badanym okresie czasu można poczynić następujące spostrzeżenia: Po 60 godzinach hodowli w warunkach termostatowych ilość drobnoustrojów wzrosła gwałtownie. W miarę trwania doświadczenia, przy utrzymywaniu tych samych warunków termicznych i wilgotnościowych, ilość drobnoustrojów malała. Doszczepianie *Str. griseus 3496* do wszystkich trzech typów gleb wyraźnie zmieniło ilościowe stosunki między bakteriami a promieniowcami. Stosunek ten ulega dalszym zmianom, zbliżając się pod koniec doświadczenia do wartości charakterystycznych dla mikroflory tych gleb w stanie wyjś-

ciowym. Potwierdzają to szczególnie dane dla gleby torfowej i leśnej. Dowodzi to, że zmiany w składzie mikroflory w określonych typach gleb, wywołane doszczepieniem nowego składnika mikrocenozy, posiadają raczej charakter przejściowy.

W naszym doświadczeniu można się było spodziewać zmian w składzie mikroflory nie tylko na skutek włączenia nowego szczepu, lecz przede wszystkim na skutek jego wyjątkowych własności (silnej aktywności antybiotycznej). Z porównania bezwzględnych ilości bakterii w szeregach kontrolnych oraz doświadczalnych wynika, że w glebie torfowej zmniejszenie ilości bakterii w szeregach zawierających *Str. griseus* nastąpiło po 10, 17 i 34 dniach inkubacji. W późniejszym okresie ilość bakterii w obu szeregach była mniejwięcej taka sama. Na glebie ogrodowej wyraźny spadek ilości bakterii wystąpił już po 60 godzinach i utrzymał się, wprawdzie w stopniu nieznacznym, aż do końca obserwacji. Na jałowej glebie leśnej stwierdzono wyraźną przewagę promieniowców w próbkach ze *Str. griseus*, ilość bakterii pozostała jednak przez cały okres doświadczenia taka sama jak w szeregu kontrolnym.

Nie rozporządzamy dostatecznie czułą metodą, która pozwoliłaby na stwierdzenie, że pod wpływem zwiększenia ilości promieniowców antybiotycznych sama gleba nabywa właściwości antybiotycznych. Trudno jest przeto stwierdzić, czy zmiany w ilościach bakterii są następstwem antybiotycznego działania siedliska, czy też raczej skutkiem naruszenia pewnej równowagi biocenotycznej. Przyczyny zmian w ilościach bakterii możnaby doszukiwać się w konkurencji sztucznie zwiększonej ilości promieniowców w przyswajaniu aktualnych zasobów pokarmowych gleby. Można by zatem w tym wypadku mówić o antagonizmie promieniowców w stosunku do bakterii, polegającym na stwarzaniu warunków głodowych, a nie na hamującym, trującym bądź litycznym działaniu wydzielanych i utrzymujących się w stanie aktywnym w glebie antybiotyków.

W celu zbadania, czy przy pomocy stosowanych metod można wykazać właściwości antybiotyczne gleby, przeprowadzono w ciągu trwania powyższego doświadczenia następujące badania kontrolne:

Płytki Petriego z pożywką agarowo-bulionową posiewano równomiernie zawiesiną 24-godzinnej kultury *B. subtilis ATCC 6633* jako mikroorganizmu testowego. Jednocześnie z pobieraniem próbek z gleb dla określenia ilości drobnoustrojów przenoszono na płytki mniej więcej jednakowej wielkości grudki gleby z każdej kombinacji. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37° nie stwierdzono w ani jednym przypadku stref przejaśnienia jako efektu antybiotycznego. Wynik kontroli był zatem negatywny.

Obserwacje te znajdują potwierdzenie w badaniach Siminoffa i Gottlieba (1951). Cytowani autorzy, hodując w jałowionych gle-

bach *Bacillus polymyxa* razem z antybiotycznym szczepem *Str. griseus*, stwierdzili ujemne działanie promieniowca na *Bacillus polymyxa*. Takie samo ujemne działanie wywierał jednak również nieantybiotyczny mutant *Str. griseus*.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było uzyskanie wyników, które pozwoliłyby naświetlić problem antybiozy jako zjawiska ekologicznego. W licznych publikacjach z zakresu ekologii drobnoustrojów glebowych spotkać można sugestie bądź też twierdzenia o doniosłej roli w mikrocenozie tych drobnoustrojów, o których wiadomo, że wykazują właściwości antybiotyczne. Jednak wnioskowanie o roli tych drobnoustrojów w określonym układzie ekologicznym na podstawie laboratoryjnej oceny ich właściwości nie jest słuszne i może prowadzić do mylnych wniosków. Zarówno wyniki badań innych autorów, jak również wyniki doświadczeń własnych dowodzą, że zaklasyfikowanie w laboratorium poszczególnych gatunków jako nieantybiotycznych nie jest zaprzeczeniem ich potencjalnej antybiotyczności. Szczepy takie, znajdując się w szczególnych, swoistych warunkach podłoża, właściwości te mogą ujawnić. Równocześnie wykazanie właściwości antybiotycznych danego szczepu nie jest dowodem, że realizuje je on we wszelkich warunkach. Gleba jako podłoże rozwoju drobnoustrojów jest środowiskiem o wiele bardziej złożonym niż jakiekolwiekbądź podłoże laboratoryjne, a warunki środowiska glebowego są znacznie bardziej skomplikowane i zmienne od optymalnych stałych warunków hodowli laboratoryjnej. Jeżeli zatem nawet w ustalonych warunkach hodowli przy nieznacznych modyfikacjach podłoża poszczególne szczepy wykazują różny stopień aktywności antybiotycznej, to przewidywanie, że te same szczepy w warunkach glebowych wytwarzają antybiotyki, może być zupełnie mylne.

Przyjmując nawet, że w określonych warunkach ekologicznych poszczególne szczepy wchodzące w skład mikrocenozy wytwarzają antybiotyki, nie mamy jeszcze podstaw do przypuszczania, iż w glebie zjawisko antybiozy odgrywa jakąś rolę. Wytwarzane w glebie antybiotyki zależnie od ich właściwości chemicznych oraz od składu chemicznego i biologicznego gleby mogą ulegać różnorakiej inaktywacji. Problem ten stanowi przedmiot badań prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu.

Z wyników przedstawionych w niniejszej pracy interesujące dla ekologii mogą być dane dotyczące wpływu wzbogacenia mikrocenozy glebowej dodatkową kulturą drobnoustrojów (w naszym wypadku antybiotycznego szczepu *Streptomyces griseus*). Doświadczenie wykazało, że wywo-

łane zmiany ilościowe są nietrwałe. Spostrzeżenia te mogą być jednym z dowodów niecelowości bakteryzacji gleby bez równoczesnej modyfikacji właściwości siedliska.

Z przedstawionych danych wynika, że rola antybiozy w warunkach glebowych nie jest jeszcze dostatecznie poznana. Wykazanie własności antybiotycznych szczepów wchodzących w skład mikrocenozy gleby nie daje podstaw do wnioskowania, że w warunkach glebowych te same szczepy wytwarzają antybiotyki.

*

* *

Autorzy określili aktywność antybiotyczną 3 szczepów promieniowców z rodzaju *Streptomyces* wyizolowanych z gleby oraz szczepu *Streptomyces griseus 3496* hodowanych na 10 różnych pożywkach wobec mikroorganizmów testowych: *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* H-Oxford, *Bac. subtilis ATCC 6633*, *Escherichia coli*. Metodą rysową wykazano, że poszczególne antybiotyczne szczepy użytych w doświadczeniu promieniowców dają bardzo różny stopień reakcji antybiotycznej łącznie z reakcjami zerowymi w zależności od podłoża, na którym je hodowano, oraz w zależności od drobnoustroju testowego. Metoda rozcieńczeń probówkowych dała w większości wyniki ujemne. Wyniki dodatnie nie korelowały z wynikami uzyskanymi metodą rysową.

W doświadczeniu prowadzonym przez 4 miesiące nad wpływem doszczepiania antybiotycznego szczepu *Streptomyces griseus 3496* do trzech różnych typów gleb wykazano, że wywołane zmiany w mikroflorze badanych gleb mają charakter przejściowy. Na podstawie danych z literatury oraz wyników własnych badań autorzy wysuwają tezę, że zjawisko antybiozy w glebie jako skutek obecności potencjalnie antybiotycznych drobnoustrojów w mikrocenozie glebowej nie jest jeszcze udowodnione.

LITERATURA

Ainsworth G. C., Brown A. M., Mardsen P. S. S. F., Smith P. A., Spilsburg J. F., 1947: A method for the large scale production of streptomycin by surface culture, *J. Gen. Microbiol.* **1**: 335.

Borensztajn D., Wolf J., 1955: Badania nad zwiększeniem wydajności *Str. rimosus. Med. Dośw. i Mikrobiol.* **7**: 125.

Di Raimondo F., Ortali V., 1948: Sull'azione antibiotica della streptomicina assiociata a diverse sostanze. *Ist. Super. Sanita* 11, I: 1230, II: 1238, III 1245

Duda J., Giebel-Pędziwilk, Z. Malińska E., 1957: Wstępne badania nad mikroflorą gleb łąkowych doliny Noteci. *Roczn. Nauk Roln.* (w druku).

Duggar B. M., Van Dyck P., de Sommer P., 1952: Antibiotics and Chemotherapy **2**, 184. (wg Kuryłowicz W., Korzybski T., Niedźwiedzka-

Trzaskowska I., Kowszyk Z., Borensztajn D., Woźnicka W.: Metoda otrzymywania aureomycyny. PZWL. W-wa 1954).

Dulaney E. L., 1948: Observations on *Streptomyces griseus*. II Nitrogen sources for growth and streptomycin productions. *J. Bact.* **56**: 305.

Green S. R., 1947: A contribution to our knowledge of the mode of action of streptomycin. *J. Bact.* **54**: 7.

Johnson M. J., 1952: Bull. of the W.H.O. 62. N. 99, 1 (wg Kuryłowicz W., Korzybski T., Niedźwiedzka-Trzaskowska I., Kowszyk Z., Borensztajn D., Woźnicka W. Metoda otrzymywania aureomycyny. PZWL. W-wa 1954).

Kuryłowicz W., Ślopek S., 1950: Streptomycyna. PZWL. W-wa.

La Page G. A., Campell E., 1946: Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem.* **62**: 163.

Lindner F., Walhäuser, 1955: Die Arbeitsmethoden der Forschung zur Auffindung neuer Antibiotica. *Arch. Mikrobiol.* **22**: 219.

Paine T. F., Clark L. S., 1954: The effects of streptomycin on resting suspensions of *Escherichia coli* grown on the three carbon sources. *Antibiotics and Chemoterapy*, **3**: 262.

Paszkiewicz A., 1955: Poszukiwanie promieniowców antybiotycznych. *Med. Dośw. i Mikrobiol.* **7**: 177.

Perlman D., 1950: *Botan. Review.* **16**: 449. (Wg Kuryłowicz W., Korzybski T., Niedźwiedzka-Trzaskowska I., Kowszyk Z., Borensztajn D., Woźnicka W. Metoda otrzymywania aureomycyny. PZWL. W-wa 1954).

V. Plotho O., 1940: Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, **11**: 33.

Pridham G. T., Gottlieb D., 1948: *J. Bact.*, 56: 107. (wg Kuryłowicz W. Niedźwiedzka-Trzaskowska I., Borensztajn D., Woźnicka W. Badania nad otrzymywaniem aureomycyny w skali ćwierćtechnicznej i laboratoryjnej. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1954: **6**: 57).

Rake G., Donovick R., 1946: Studies on the nutritional requirements of *Actinomyces griseus* for the formation of streptomycin. *J. Bact.*, **51**: 596.

Rao R., Rao S., Ventkataraman P. R., 1946: Utilization of groundnut-cake hydrolysate as medium for production of streptomycin. *J. Biol. Chem.*, **158**: 23.

Siminoff P., Gottlieb D., 1951: The production and role of antibiotics in the soil. I The fate of streptomycin. *Phytopathology*, **42**: 294.

Strutz I., 1952: Beiträge zur Kenntnis der Biologie der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, **17**: 353.

Treffers H. P., 1946. The potentation of penicilin or streptomycin action by certain enzyme inhibitors. *J. Bact.* **52**: 502.

Waksman S. A., 1945: Microbial antagonisms and antibiotic substances. New York. The Commonwealth Fund.

Waksman S. A., 1947: Certain aspects of the physiology of Actinomycetes. *Leeuvenhoek J. Microb.*, **12**: 50.

Waksman S. A., Henrici A. T., 1943: *J. Bact.* 339 (wg *Bergeys* Manual of Determinative Bacteriology., 1949: VI. Ed.).

Waksman S. A., Schatz A., 1945: Streptomycin, origin, nature and properties. *J. Am. Pharm. A.*, **34**: 273.

Williston G. T., Pari Zia-Walrath, Youmans G. P., 1947: Plate

method for testing antibiotic activity of Actinomycetes against virulent human tubercle bacilli. *J. Bact.*, **54**: 563.

Woodruf H. B., Ruger M., 1948: Studies on the physiology of a streptomycin producing strain of *Streptomyces griseus* on proline medium. *J. Bact.*, **56**: 355.

J. Duda and *H. Kaszubiak*

STUDIES ON THE INFLUENCE OF THE NUTRIENT-MEDIUM ON ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES*

Summary

Researches were conducted on three strains of *Streptomyces sp.* freshly isolated from soil and on *Str. griseus 3496*. Antibiotic activity of *Streptomycetes* was studied by the streak-method on ten various agar-media against four test bacteria strains (*Sarcina lutea, Micrococcus pyogenes v. aureus H. Oxford, Bacillus subtilis ATCC 6633* and *Escherichia coli*).

The fluid cultures were shown to be unsuitable for measuring of antibiotic activity.

It was ascertained that antibiotic activity of streptomycetes was strongly influenced by kind of the medium used (table III).

Further experiments were devoted to examination of the effect of *Str. griseus* on soil microflora.

Three various soils were inoculated with *Str. griseus* spores in pot-experiment. During 4-months period samples were taken at appropriate times and examined for the number of bacteria, streptomycetes by plate dilution method (table VII).

No visible influence of antibiotic strain on native soil microflora was noted. It is authors' opinion that the rôle of antibiotic producing strains in modelling of soil microcenozis is at present unknown.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, t. 269-287

N. Balicka i *J. Sobieszczański*

GLEBA JAKO FILTR BAKTERYJNY PRZY ROLNICZYM WYKORZYSTANIU ŚCIEKÓW MIEJSKICH

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej
we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 27 maja 1957 r.

Zadaniem pól irygacyjnych jest przefiltrowanie ścieków miejskich i odprowadzenie oczyszczonej wody do zbiorników wodnych. Równocześnie zatrzymane przez glebę składniki pokarmowe i woda służą do podniesienia produkcji roślinnej. Zwyżki plonów uzyskiwane dzięki nawodnieniu i nawożeniu ściekami mogą być znaczne. Według Wierzbickiego (1952) łąki nawadniane ściekami mogą dać zwyżkę plonów do 400%. Obok niewątpliwych korzyści związanych z rolniczym wykorzystaniem ścieków miejskich istnieje też problem usunięcia drobnoustrojów obecnych w dużych ilościach w ściekach i wodach zanieczyszczonych ściekami (Paluch, 1956). Szczególna uwaga należy się drobnoustrojom chorobotwórczym (Mochman, 1955).

Ponieważ gleba ma spełnić rolę filtru i uwolnić wodę od czynnika zakaźnego, zachodzi potrzeba określenia, w jakich warunkach proces ten przebiega we właściwy sposób. W pracy podjętej przez autorów badano wpływ niektórych czynników na proces oczyszczania ścieków miejskich Wrocławia. W tym celu w latach 1955-1957, założono szereg doświadczeń w warunkach laboratoryjnych, przy pomocy których próbowano rozwiązać następujące zagadnienia:

1) Wpływ składu mechanicznego i struktury gleby na jej zdolność filtracyjną w stosunku do *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*,

2) Wpływ miąższości warstwy gleby na stopień oczyszczania ścieków od bakterii,

3) Wpływ uwilgotnienia gleby i ilości wprowadzonego ścieku na jej zdolność filtracyjną.

4) Możliwość wypłukiwania przy pomocy wody drobnoustrojów zatrzymanych przez glebę.

Stopień zanieczyszczenia ścieków, wody odciekającej oraz nawadnianej gleby określano przy pomocy ogólnie przyjętych wskaźników sanitarnych: miana *coli* i miana *perfringens*. Miano *coli* oznaczano na pożywce płynnej Buliña (H a m p l, 1946), a miano *perfringens* na pożywce żelazowo-siarczynowej W i l s o n a i M c B l a i r a (T e c, 1955).

WPŁYW SKŁADU MECHANICZNEGO I STRUKTURY GLEBY NA JEJ ZDOLNOŚĆ FILTRACYJNĄ

DOŚWIADCZENIE I

Do lejków szklanych o średnicy 10 cm i wysokości 9 cm nasypano 5 różnych gleb (w dwu powtórzeniach):

1) ił,
2) glina średnia,
3) glina lekka pylasta,
4) piasek luźny drobnoziarnisty,
5) piasek rzeczny.

Próbki gleby otrzymano z Katedry Gleboznawstwa Wyższej Szkoły Rolniczej w stanie powietrzno-suchym. Skład chemiczny podano w tabeli I.

Tabela I

Skład mechaniczny gleb w %, według Gedrojcia
Die mechanische Zusammensetzung der Böden in %

Gleba—Boden	Części — Teile		Średnica części ziemistych w mm Der Durchmesser der erdartigen Teile in mm				
	szkieletowe Skelett-Teilen >1 mm	ziemiste u. Erd- <1 mm	0,1—1	0,02—0,1	0,006—0,02	0,002—0,006	0,002
Ił Ton	0,2	99,8	5,0	10,0	21,0	30,0	34,0
Glina średnia Mittlerer Lehm	4,0	96,0	37,0	22,0	7,0	16,0	18,0
Glina lekka Leichter Lehm	7,0	93,0	54,0	25,0	7,0	4,0	10,0
Piasek luźny drobnoziarnisty Feinkörniger lockerer Sand	6,1	93,9	90,0	7,0	1,0	1,0	1,0

Po napełnieniu lejków, gleby nasycono wodą do pełnej pojemności, a następnie podlewano zawiesiną *E. coli*, typ jelitowy (według Levina za Przesmyckim, 1951), wyodrębnionej ze ścieków miejskich. Ściek pochodził ze Stacji Pomp we Wrocławiu. Wodną zawiesinę *E. coli* wprowadzano do każdej próbki 5 razy w ciągu 2 miesięcy. Jednorazowa dawka zawiesiny wynosiła 20 ml. Odciek z gleby odbierano do sterylnych probówek i oznaczano w nim miano *coli*. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli II.

Tabela II

Miano *coli* w odcieku z gleb po podlaniu ich zawiesiną *E. coli* (miano *coli* 0,00001)

Doświadczenie I

Der Colititer in Bodenabfluss nach Berieselung mit *E. coli* (Colititer 0,00001)

I Versuch

Gleba Boden	Data podlania Datum der Berieselung					Odciek w ml (średnia) Abfluss in ml (durchschnittlich)
	15. III	24. III	26. III	28. III	10. V*	
Il Ton	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	17
Glina średnia Mittlerer Lehm	<0,01	0,001	0,0001	0,0001	<0,01	16
Glina lekka Leichter Lehm	0,001	0,0001	0,00001	0,00001	<0,01	17
Piasek luźny drobnoziarnisty Lockerer feinkörniger Sand	0,000001	0,000001	0,0000001	0,0000001	0,01	16
Piasek rzeczny Flussand	0,000001	0,000001	0,00001	0,00001	0,001	17

* podlane ściekiem surowym — miano *coli* 0,0001

Jak wynika z tabeli I i II, filtrowanie zawiesiny *E. coli* przez 9-centymetrową warstwę gleby (kształtu lejka) zależało od jej składu mechanicznego. Miano *coli* w odcieku z piasku było równe albo nawet w niektórych przypadkach wyższe aniżeli miano w zawiesinie. Odciek z iłu, w porównaniu z innymi glebami wykazywał najniższe miano *coli* we wszystkich próbach. Natomiast miano *coli* w odcieku z gliny lekkiej i średniej stosunkowo niskie przy pierwszym podlaniu wzrastało w miarę wprowadzania nowych dawek zawiesiny bakterii. W wypadku gliny lek-

kiej już po trzecim podlaniu (26. III) miano *coli* w odcieku było takie jak w zawiesinie. Po 6-tygodniowej przerwie podlano gleby ściekiem surowym. W odcieku ze wszystkich gleb stwierdzono mniejszą ilość *E. coli* niż w poprzednich próbach (tylko miano *coli* w odcieku z iłu utrzymywało się stale na tym samym poziomie).

W przeprowadzonym doświadczeniu, przy użyciu bardzo małych ilości gleb, wyższa zdolność filtracyjna związana była z większą zawartością części spławialnych (0,02-< 0,002 mm).

DOŚWIADCZENIE II

W tym doświadczeniu badano wpływ naturalnej struktury gleby na jej zdolność filtracyjną. Do badań zostały wzięte następujące gleby:

1) Mada lekka — darń wieloletnia,
2) Mada lekka — pole uprawne zasadzone ziemniakami,
3) Mada średnia — darń wieloletnia,
4) Mada średnia — pole uprawne zasiane burakami cukrowymi,
5) Gleba piaszczysta — darń wieloletnia,
6) Gleba piaszczysta — pole uprawne zasadzone ziemniakami.

Gleby 1, 2, 3 i 4 pobrano z pól Stacji Doświadczalnej w Swojcu, a gleby 5 i 6 z pól Zakładu Doświadczalnego IUNG w Laskowicach.

Po dwóch miesiącach od założenia doświadczenia dodano cztery nowe kombinacje, a mianowicie:

7) Piasek luźny, gruboziarnisty, zasiany jęczmieniem,
8) Piasek luźny, gruboziarnisty, bez roślin,
9) Piasek luźny, drobnoziarnisty, zasiany jęczmieniem,
10) Piasek luźny, drobnoziarnisty, bez roślin.

Próbki gleby pobierano z pola przyrządem specjalnie w tym celu skonstruowanym przez J. Sobieszczańskiego (rys. 1). Przyrząd ten pozwolił na pobranie próbek gleby z zachowaniem ich naturalnej struktury. Składa się on z dwóch cylindrów *A* i *B*. Cylinder *A* zrobiony z grubej blachy mosiężnej zaopatrzony jest w tłoczek metalowy *b* poruszany przy pomocy śruby *a*. Próbkę gleby pobiera się przez wkręcanie cylindra *A* na całą jego wysokość przy pomocy uchwytów *d*, tłok *b* musi być przy tym podniesiony do góry. Następnie cylinder *A* wkłada się do kołnierza *e* w cylindrze *B* i wyciska się pobrany słup gleby przez powolne pokręcanie śruby *a*. Średnice cylindrów *A* i *B* są jednakowe.

W ten sposób uzyskiwaliśmy próbki gleby o miąższości 28 cm, a średnicy 8 cm, zachowujące prawie naturalną strukturę. Cylindry *B* posiadające dno z gęstej siatki metalowej ustawiano w drewnianych stojakach i opierano na lejkach, przez które zbierano ściekającą wodę do sterylnych kalibrowanych flaszek.

Glebę w cylindrach podlewano 6-krotnie w ciągu 5 i $^1/_2$ miesięcy ście-

Tabela III

Miano *coli* i *perfringens* w odcieku z gleby o strukturze naturalnej po podlaniu jej ściekiem surowym (doświadczenie II)

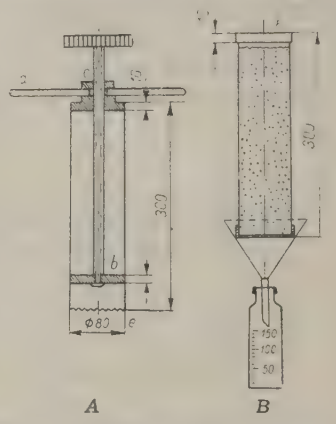
Coli-und Perfringenstiter im Abfluss vom Boden in natürlicher Struktur, nach Berieselung mit Abwasser (II Versuch)

Gleba Boden	Data podlania Datum der Berieselung											Odciek w ml (średni) Abfluss in ml (durchschnittlich)
	13. X		17. IX		10. X		19. 10		14. IX	15. II	20. II	
	coli	*perfringens*	*coli*	*perfringens*	*coli*	*perfringens*	*coli*	*perfringens*	*coli*	*coli*	*coli*	
Mada lekka — darń Leichter Aueboden — Grassland	0,1	0,01	0,01	0,1	0,001	0,01	0,01	0,01	0,001	0,001	0,001	50
Mada lekka — pole uprawne Leichter Aueboden — Acker	0,01	0,001	0,01	0,1	0,001	0,1	0,1	0,1		0,01	0,001	42
Mada średnia — darń Mittlerer Aueboden — Grassland	0,01	0,01	0,0001	0,01	0,0001	0,001	0,0001	0,01		0,0001	0,0001	40
Mada średnia — pole uprawne Mittlerer Aueboden — Acker	0,001	0,001	0,0001	0,01	0,0001	0,001	0,0001	0,001		0,0001	0,0001	32
Piaszczysta — darń Sandboden — Grassland	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,01		0,01	0,01	42
Piaszczysta — pole uprawne Sandboden — Acker	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,1		0,01	0,1	40
Piasek gruboziarnisty — zasiany Grobkörniger Sand angesät									0,1	0,01	0,01	75
Piasek gruboziarnisty — bez roślin Grobkörniger Sand ohne Pflanzen									0,01	0,1	0,1	59
Piasek drobnoziarnisty — zasiany Grobkörniger Sand angesät									0,1	0,1	0,01	28
Piasek drobnoziarnisty — bez roślin Feinkörniger Sand ohne Pflanzen									0,1	0,1	0,1	28

kiem surowym w ilości 100 ml na cylinder. W odcieku oznaczano miano *coli* i *perfringens* (tabela III). Wilgotność wszystkich próbek gleb w czasie trwania doświadczenia utrzymywała się mniej więcej na tym samym poziomie, w granicach od 11 do 19% w stosunku do suchej masy gleby.

Według danych tabeli III wysokość wskaźników sanitarnych w przecieku z poszczególnych gleb utrzymywała się przez cały czas trwania doświadczenia prawie na jednakowym poziomie. Nie widać było wyraźnego wpływu roślin na przepuszczalność gleb i ich zdolność filtracyjną.

Wyniki z doświadczenia I wskazywałyby na to, że zdolność filtracyjna gleby zależała przede wszystkim od jej składu mechanicznego, natomiast na podstawie omawianego doświadczenia można by wnioskować, że decydującym czynnikiem była struktura gleby. Gliny lekkie, mimo że posiadały największą ilość części spławialnych (tabela IV), przepuściły więcej bakterii aniżeli luźne piaski o nieznacznej zawartości części spławialnych. Najwyższe miana wykazywał odciek z gleby najcięższej (mada średnia). Przypuszczamy, że zjawisko to związane było ze strukturą gruzełkową tej gleby i jej przepuszczalnością.



Rys. 1. Aparat do pobierania próbek gleby z zachowaniem ich struktury naturalnej

Fig. 1. Apparat zur Entnahme von Bodenproben unter Belassung ihrer natürlichen Struktur

Porównując wyniki doświadczenia I i II, widzimy różnicę przy filtrowaniu ścieku przez piasek. Przyczyną rozbieżności wyników była prawdopodobnie miąższość warstwy filtrującej. Po przejściu zawiesiny bakterii przez 9-centymetrową warstwę piasku kształtu lejka miano *coli* nie ulegało zmniejszeniu. Natomiast przy warstwie o 28 cm grubości obserwowano wyraźny spadek miana *coli* w odcieku.

Celem sprawdzenia zależności między wysokością słupa gleby a jego zdolnością filtracyjną założono doświadczenie III.

WPŁYW MIĄŻSZOŚCI WARSTWY GLEBY NA OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW OD BAKTERII

DOŚWIADCZENIE III

Do cylindrów nasypano 2 różne gleby: piasek i madę średnią tworząc warstwy o grubości: 5, 10, 15, 20 i 25 cm. Skład mechaniczny podano w tabeli V.

Tabela IV

Skład mechaniczny gleb w % (doświadczenie II)
Die mechanische Zusammensetzung der Böden in % (II Versuch)

Gleba Boden	Części szkieletowe >1 mm	Części ziemiste <1 mm	Średnica części ziemistych w mm Die Durchmesser der erdartigen Teile in mm				
	Skelett-u. Erd-Teile		1—0,1	0,1—0,02	0,02—0,006	0,006—0,002	<0,002
Mada lekka — darń Leichter Aueboden Grasland	3,2	96,8	71,0	20.0	3,0	0,0	6,0
Mada lekka — pole uprawne Leichter Aueboden — Acker	3,2	96,8	74,0	16,0	4,0	0,0	6,0
Mada średnia — darń Mittlerer Aueboden Grasland	11,2	88,8	62,0	19,0	5,0	3,0	11,0
Mada średnia — pole uprawne Mittlerer Aueboden — Acker	13,8	86,2	64,5	16,5	6,0	2,0	11,0
Piaszczysta — darń Sandboden — Grasland	2,9	97,1	64,0	33,0	0,0	0,0	3,0
Piaszczysta — pole uprawne Sandboden — Acker	1,0	99,0	87,0	10,0	1,0	0,0	2,0
Piasek luźny gruboziarnisty zasiany Lockerer grobkörniger Sand angesät	14,7	85,3	97,0	3,0	0,0	0,0	0,0
Piasek luźny gruboziarnisty i bez roślin Lockerer, grobkörniger Sand ohne Pflanzen	17,4	82,6	97,0	2,0	1,0	0,0	0,0
Piasek luźny gruboziarnisty zasiany Lockerer, grobkörniger Sand angesät	0,2	99,8	97,0	2,0	1,0	0,0	0,0
Piasek luźny gruboziarnisty bez roślin Lockerer, grobkörniger Sand ohne Pflanzen	0,1	99,9	97.0	2,0	0,0	1,0	0,0

Przed wprowadzeniem ścieku glebę nasycano do pełnej pojemności wodą. Próbę filtrowania przeprowadzano dwukrotnine w czasie od 5. IV. do 4. V. 1957 r. wlewając po 50 ml ścieku do każdego cylindra. Miano *coli* i *perfringens* oznaczano w pierwszych kroplach i następnie w pozostałym odcieku (tabela VI). Średnia ilość odcieku z cylindra wynosiła 48 ml. Badanie pierwszych kropli odcieku miało na celu zaobserwowanie zmian w procesie filtrowania w miarę nasycania gleby ściekiem.

Tabela V

Skład mechaniczny gleb w % (doświadczenie III)
Die mechanische Zusammensetzung in % (III Versuch)

Gleba Boden	Części szkieletowe Skelett-u. Erd.-Teile >1 mm	Części ziemiste Skelett-u. Erd.-Teile <1 mm	Średnica części ziemistych w mm Die Durchmesser der erdartigen Teile in mm 1—0,1	0,1—0,2	0,2—0,006	0,006—0,002	<0,002
Mada średnia Mittlerer Aueboden	5,4	94,6	67,0	13,0	5,0	7,0	8,0
Piasek luźny Lockerer Sand	7,6	92,4	95,0	3,0	1,0	0,0	1,0

W tym doświadczeniu filtracja zachodziła w luźno ułożonej warstwie piasku oraz w glebie, która zachowała mikroagregaty, ale pozbawiona została układu strukturalnego wskutek nasypywania do cylindrów. Porównując na podstawie uzyskanych wyników przebieg filtracji w piasku i w glebie, widzimy, że na ogół piasek lepiej usuwał ze ścieków *E. coli* i *Cl. perfringens* niż użyta gleba. Zarysowywała się też zależność pomiędzy grubością warstwy gleby a stopniem oczyszczenia ścieku. Już 5-centymetrowa warstwa powodowała obniżenie miana *coli* z 0,00001 do 0,0001—0,01, miana zaś *perfringens* z 0,0001 do 0,01-0,1. Zwiększenie warstw do 10 i 15 cm wywołało dalsze stopniowe obniżanie ilości bakterii w odcieku. Po przejściu ścieku przez warstwy gleby 20 - 25 cm miano *coli* w odcieku spadało do 0,01, 0,1 i poniżej.

Popp i współpracownicy (1955) podają, że przy nawadnianiu gleby ściekiem w ilości 60 - 70 ml *E. coli* przenika do głębokości 20 - 50 cm. Nasze próby (Balicka i Sobieszczański, 1956) wykonane na terenie doświadczenia polowego St. Marcilonka na Psim Polu wykazały, że po nawodnieniu pól ściekiem miejskim miano coli w studzienkach kontrolnych na głębokości 60 - 90 cm pozostawało nadal niskie. Zdaniem Poppa poziom, do którego dochodzą bakterie, zależy od pojemności wodnej gleby i wysokości dawki ścieku.

Tabela VI

Miano *coli* i *perfringens* w odcieku z gleby po podlaniu jej ściekiem surowym (doświadczenie III)
(miano *coli* — 0,00001, miano *perfringens* — 0,0001)
Coli- und Perfringenstiter in Abfluss vom Boden nach Berieselung mit Abwasser (III Versuch)
(Colititer — 0,00001, Perfringenstiter — 0,0001)

Gleba Boden	Warstwa filtrująca w cm Die filtrirende Schicht cm	Data podlania: Datum der Berieselung							
		5. IV				4. V			
		Pierwsze krople Die ersten Tropfen		Cały odciek Der ganze Abfluss		Pierwsze krople Die ersten Tropfen		Cały odciek Der ganze Abfluss	
		coli	*perfringens*	*coli*	*perfringens*	*coli*	*perfringens*	*coli*	*perfringens*
Mada	5	0,01	0,01	0,01	0,01—0,1	0,001	0,001	0,0001	0,01
średnia	10	0,01	0,01—0,1	0,01	0,01—0,1	0,001	0,01	0,0001	0,01
Mittlerer	15	0,01	0,01—0,1	0,01	0,01—0,1	0,001	0,01	0,0001	0,01
Aueboden	20	0,01	0,1	0,01—0,1	0,1	0,01	0,1	0,001	0,1
	25	0,01	0,1	0,01—0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,1
Piasek luźny	5	0,01	0,01—0,1	0,01—0,1	0,01—0,1	0,1	0,1	0,001	0,01
Lockerer	10	0,01	0,01—0,1	0,01—0,1	0,01—0,1	0,1	0,01	0,1	0,1
Sand	15	0,01	0,1	0,01—0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	20	0,01—0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	25	0.1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Wpływ wysokości dawki ścieku na przechodzenie bakterii przez glebę zanotowaliśmy również i w naszych doświadczeniach. Przy wielokrotnym podlewaniu zwiększało się miano *coli* w odcieku z niektórych gleb (glina średnia i lekka w doświadczeniu I i mada średnia w doświadczeniu II). Celem sprawdzenia tych spostrzeżeń nastawiono doświadczenie, w którym obserwowano równocześnie wpływ wilgotności gleby na zatrzymanie się w niej *E. coli* i *Cl. perfringens*.

WPŁYW UWILGOTNIENIA GLEBY I ILOŚCI ŚCIEKU NA JEJ ZDOLNOŚĆ FILTRACYJNĄ

DOŚWIADCZENIE IV

Próbę nastawiono w cylindrach metalowych dokładnie wyparafinowanych, o średnicy 11 cm i wysokości 15 cm. Napełniono je glebą w stanie powietrzno suchym. Skład mechaniczny tej gleby był następujący: 1,3% części szkieletowych i 98,7% części ziemistych. Części ziemiste dzieliły się na: 72,0% frakcji piasku, 16,0% pyłu i 12,0% części spławialnych. Ilość równoległych powtórzeń 3. Przed wprowadzeniem ścieku glebę nasycano do pełnej pojemności w rozmaity sposób, mianowicie:

1) ściekiem 600 ml,
2) wodą 600 ml,
3) mieszaniną wody 600 ml i ścieku 50 ml,
4) ściekiem zagotowanym 600 ml.

Następnie do kombinacji 1, 2, 4 wlano po 50 ml ścieku. Dodatkową kombinację stanowiła gleba nasycona wodą, a potem podlana 600 ml ścieku. Miano *coli* w ścieku wynosiło 0,00001, a miano *perfringens* 0,0001. Miano *coli* w mieszaninie wody i ścieku równało się 0,0001, a *perfringens* 0,01. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli VII.

Jak widzimy, miano *coli* w odcieku z gleby było różne zależnie od sposobu jej nasycenia i wysokości dawki ścieku. Najwyższe było w kombinacji, gdzie powietrznie suchą glebę nasycano ściekiem surowym (600 ml + 50 ml) — utrzymywało się na wysokości miana ścieku. Jeżeli ściek użyty do nasycenia gleby uprzednio zagotowano, filtrowanie ścieku surowego następowało zupełnie dobrze (0,1 w odcieku). Podobnie oczyszczała ściek gleba nasycona wodą wodociągową. Przy użyciu mieszaniny wody i ścieku miano *coli* w odcieku było obniżone w stosunku do ścieku, ale wyższe aniżeli w wypadku nasycenia powietrznie suchej gleby wodą lub ściekiem zagotowanym.

Miano *perfringens* w odcieku z wszystkich kombinacji było podobne — przeszło 2-4-krotnie niższe niż w ścieku.

Ponieważ przypuszczaliśmy, że większa dawka ścieku spowoduje wzrost ilości bakterii w odcieku, analizowano go dwukrotnie: pierwsze

Tabela VII

Miano *coli* i *perfringens* w odcieku z gleby różnie nasycanej (doświadczenie IV)
Coli- und Perfringenstiter in Abfluss von unterschiedlich gesättigten Boden (IV Versuch)

Sposób nasycania gleby Sättigungsart des Bodens	Pierwsze krople Die ersten Tropfen		Cały odciek Der ganzen Abfluss		Odciek w ml (średnia) Abfluss in ml (durchschnittlich)
	coli	*perfringens*	*coli*	*perfringens*	
Ściekiem 600 ml durch Abwasser	0,0001	<0,1	0,00001	0,01	54
Wodą — 600 ml durch Wasser	0,1	<0,1	0,01	0,1	33
Mieszaniną wody (600 ml) i ściekiem (50 ml) durch Mischung von Wasser mit i Abwasser			0,001	0,01	31
Ściekiem zagotowanym durch gekochtes Abwasser	0,1	<0,1	0,1	0,1	40
Wodą (600 ml) + ściek (600 ml) durch Wasser (600 ml) + Abwasser (600 ml)	0,001	0,1	0,0001	0,1	577

odciekające krople, a następnie pozostały odciek. Stwierdzono, że przy nasyceniu gleby samym ściekiem już pierwsze krople odcieku wykazywały wysokie miano *coli* (0,0001), które wzrastało do 0,00001 w całym odcieku. Miano *coli* w kombinacjach nasyconych wodą lub ściekiem zagotowanym nie wykazywało większych różnic w pierwszych kroplach i w pozostałym odcieku.

Przy zwiększeniu dawki ścieku do 600 ml stwierdzono przechodzenie do odcieku znacznej ilości *E. coli*, wyrażone wysokim mianem *coli* (0,001 w pierwszych kroplach i 0,0001 w pozostałym odcieku).

Miano *perfringens* w pierwszych kroplach odciekających ze wszystkich cylindrów było niskie, a potem przeważnie nieco wzrastało.

Na podstawie uzyskanych wyników należy przypuszczać, że do czyn-

ników, od których zależy zdolność filtracyjna gleby, zaliczyć można nie tylko wysokość dawki ścieku, ale również stopień jej uwilgotnienia. Wydaje się też, że duże znaczenie posiada sposób nasycenia gleby wodą. W omawianym doświadczeniu gleba wilgotna lepiej filtrowała ściek aniżeli gleba sucha, zwłaszcza dotyczyło to *E. coli*. Zjawisko to wymaga dalszego sprawdzenia i opracowania — co jest przewidziane przez autorów w dalszej części pracy.

WYPŁUKIWANIE DROBNOUSTROJÓW ZATRZYMANYCH PRZEZ GLEBĘ PRZY POMOCY WODY

Z szeregu prac Poppa i współpracowników (1955), Balickiej i Sobieszczańskiego (1956) wynika, że *E. coli* zatrzymane przez glebę może zachować swoją żywotność przez kilka miesięcy a *Cl. perfringens* znacznie dłużej (Sobieszczański, nieopublikowane).

Zachodzi więc pytanie, czy pod wpływem obfitych opadów, zalewów, powodzi itp. nie zostają wypłukane bakterie chorobotwórcze zatrzymywane przez glebę w trakcie filtracji ścieków. W poszukiwaniu odpowiedzi przeprowadzono próby, do których wykorzystano próbki gleby z doświadczeń I, II i IV. Po ostatnim wprowadzeniu ścieku oznaczono w tych glebach miano *coli* i *perfringens*, a następnie podlewano je wodą. W odcieku kontrolowano obecność *E. coli* i *Cl. perfringens*. Wyniki są podane w tabelach VIII, IX, X i XI.

Tabela VIII

Miano *coli* w glebie i w odcieku po podlaniu wodą
(doświadczenie I)
Colititer im Boden und Abfluss vom Boden nach Berieselung mit Wasser
(I Versuch)

Gleba Boden	Miano w glebie im Boden		Miano w odcieku im Abfluss	
	10. IV	18. IV	20. IV	28. IV
II				
Ton	0,000001	0,1		
Glina średnia				
Mittlerer Lehm	0,00001	0,01		
Glina lekka				
Leichter Lehm	0,00001	0,0001	0,001	
Piasek drobnoziarnisty luźny				
Lockerer feinkörniger Sand	0,0000001	0,000001	0,0001	0,001
Piasek rzeczny				
Flusssand	0,0001	0,0001	0,001	0,01

Dawka wody przy podlewaniu 18. IV. wynosiła 20 ml. 20. IV. — 200 ml, a 28. VI. — 200 ml. Miano *coli* we wszystkich glebach było wysokie (0,0001 - 0,001). Wypłukiwanie bakterii wodą sterylną miało miejsce w glebach lekkich (piasek, glina lekka), natomiast z gliny średniej, a zwłaszcza z iłu do odcieku przechodziło mniej *E. coli*. Po trzykrotnym przelaniu wodą miano *coli* zmniejszało się również w odcieku z gleb lekkich.

W doświadczeniu II, w cylindrach z glebą o strukturze naturalnej miano *coli* oznaczano w 4 poziomach: w warstwie 0 - 7 cm, 7 - 14 cm, 14 - 21 cm i 21 - 28 cm (tabela IX), celem zaobserwowania rozmieszczenia bakterii w słupie badanych gleb po przejściu ścieku. Następnie podlewano je wodą sterylną w czterech dawkach: 100 ml, 50 ml, 50 ml i 50 ml. Za każdym razem badano czystość odcieku (tabela X).

Tabela IX

Miano *coli* i *perfringens* w glebie (doświadczenie II)
Coli- und Perfringenstiter im Boden (II Versuch)

Gleba Boden	Głębokość pobrania próbki w cm Tiefe der Probeentnahme in cm	Miano Titer	
		coli	*perfringens*
Mada lekka Leichter Aueboden	0—7	0,0001	0,001
	7—14	0,001	0,001
	14—21	0,001	0,001
	21—28	0,001	0,01
Mada średnia Miittlerer Aueboden	0—7	0,001	0,0001
	7—14	0,001	0,001
	14—21	0,001	0,001
	21—28	0,001	0,001
Gleba piaszczysta Sandiger Boden	0— 7	0,001	0,001
	7—14	0,01	0,01
	14—21	0,01	0,01
	21—28	0,01	0,01
Piasek luźny gruboziarnisty Lockerer grobkörniger Sand	0— 7	0,01	0,001
	7—14	0,01	0,001
	14—21	0,01	0,01
	21—28	0,1	0,01
Piasek luźny drobnoziarnisty Lockerer feinkörniger Sand	0— 7	0,01	0,01
	7—14	0,01	0,01
	14—21	0,1	0,01
	21—28	0,1	0,01

W tym doświadczeniu, przy pomocy zastosowanych wskaźników wykazano niewielkie różnice w zanieczyszczeniu poszczególnych poziomów gleby. Górne warstwy wykazywały na ogół wyższe miano *coli* i *perfringens* niż głębsze. Należy zaznaczyć, iż Popp i współpracownicy uważają, że *E. coli* rozchodzi się równomiernie w glebie razem z wodą.

Tabela X

Miano *coli* i *perfringens* w odcieku z gleby po podlaniu wodą (doświadczenie III)
Coli- und Perfringenstiter im Bodenabfluss nach Berieselung mit Wasser (III Versuch)

Gleba Boden	Dawka wody Die Wassermenge w ml	Odciek Abfluss w ml	Miano Titer *coli*	Miano Titer *perfringens*
	100	51	0,1	0,1
Mada lekka	50	46	<0,1	<0,1
Leichter Aueboden	50	60	<0,1	<0,1
	50	46	<0,1	<0,1
	100	49	0,01	0,1
Mada średnia	50	49	0,01	0,1
Mittlerer Aueboden	50	48	0,01	0,1
	50	52	0,1	0,1
	100	28	<0,1	<0,1
Gleba piaszczysta	50	49	<0,1	<0,1
Sandiger Boden	50	53	<0,1	<0,1
	50	52	<0,1	<0,1
	100	31	<0,1	<0,1
Piasek luźny drobnoziarnisty	50	52	<0,1	<0,1
Lockerer feinkörniger Sand	50	49	<0,1	<0,1
	50	52	<0,1	<0,1
	100	33	<0,1	<0,1
Piasek luźny gruboziarnisty	50	48	0,1	<0,1
Lockerer grobkörniger Sand	50	60	0,1	<0,1
	50	58	0,1	<0,1

Miano *coli* i *perfringens* w odcieku z gleb po podlaniu ich jałową wodą w większości wypadków nie przewyższało 0,1. a tylko w jednym (mada średnia) wynosiło 0,01. Są to wartości niewysokie i wskazują raczej, że wypłukanie wodą bakterii *coli* i *perfringens* nie zachodzi.

W tym doświadczeniu miano *coli* i *perfringens* w glebie było dość wysokie, zwłaszcza w poziomie 0 - 5 cm. Łatwiej wypłukiwały się bakterie z gleby nasyconej ściekiem aniżeli wodą.

Dalszą próbę dotyczącą wypłukiwania bakterii z różnych gleb przedstawiono w tabeli XII. Trzy różne gleby zostały nasypane do cylindrów o średnicy 11 cm i wysokości 15 cm. Podlano je zawiesiną *E. coli* (18. II. 1955) w ilości około 20 miliardów komórek do każdego cylindra, a potem począwszy od następnego dnia kilkakrotnie przelewano wodą jałową. We wszystkich przypadkach uzyskiwano odciek o niskim mianie *coli*, jak w doświadczeniu II (tabela X).

Tabela XI

Miano *coli* w glebie i w odcieku po podlaniu wodą (doświadczenie IV)
Colititer im Boden und Bodenabfluss nach Berieselung mit Wasser (IV Versuch)

Kombinacja Versuchsobiekt	Głębokość pobrania próbki w cm Tiefe der Probeentnahme in cm	Gleba Boden		Odciek Abfluss	
		coli	*perfringens*	*coli*	*perfringens*
Nasycona wodą + 50 ml ścieku	0— 5	0,0001	0,001	0,01	0,01
	5—10	0,001	0,001		
	10—15	0,001	0,001		
Nasycona ściekiem (650 ml)	0— 5	0,00001	0,0001	0,0001	0,01
	5—10	0,0001	0,001		
	10—15	0,0001	0,001		

Dawka wody na cylinder wynosiła 100 ml.

Tabela XII

Miano *coli* w odcieku z różnych gleb po podlaniu ich wodą
Coltiter im Abfluss von verschiedenen Bodenarten nach Berieselung mit Wasser

Gleba Boden	Data podlania Datum der Berieselung			
	19. II	2. III	11. III	24. III
Piasek luźny Lockerer Sand	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Próchniczna gleba Humuserde	0,1	0,1	0,1	0,1
Mada średnia Mittlerer Aueboden	0,1	0,1	0,1	0,1

Dane w tabelach VIII, X, XI, XII wskazują, że wypłukiwanie *E. coli* i *Cl. perfringens* przy pomocy wody zachodziło tylko w niektórych kombinacjach, a mianowicie tych, które przy podlaniu ściekiem wykazywały

odciek o wysokich mianach (np. gleba lekka i piasek — tabela VII, lub gleba nasycona ściekiem — tabela XI). Znacznie słabsze wypłukiwanie stwierdzono natomiast w glebach, które przy wprowadzeniu ścieku dawały w odcieku niskie miana.

W czasie prób nasunęło się pytanie, czy *E. coli* w odcieku pochodzi ze ścieku, czy też jest pochodzenia glebowego. W związku z tym określano typ *coli* przy pomocy odczynów z czerwienią metylową i Voges-Proskauera oraz badając wzrost na podłożu Kosera z cytrynianem. Wyniki wskazywały na obecność w odcieku zarówno typu jelitowego jak i ziemnego pałeczki okrężnicy, co świadczyłoby o możliwości przechodzenia bakterii z gleby do odcieku. Są to jednak niewielkie ilości, o czym mówią dane z tabel XII i X (0,1 i poniżej 0,1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W założeniu pracy postawiono kilka pytań, na które przeprowadzone doświadczenia dały częściowo odpowiedzi, ale równocześnie wysunęły nowe problemy do rozwiązania. Wynika z nich, że proces filtrowania ścieków przez glebę jest zjawiskiem złożonym, zależnym od szeregu czynników, przy czym każdy z nich może w poszczególnych wypadkach odegrać mniej lub bardziej decydującą rolę.

Do oczyszczania ścieków przyczyniają się te czynniki, które zatrzymują w glebie bakterie i nie pozwalają na przenikanie ich do otwartych zbiorników wodnych.

Wydaje się, że o przebiegu filtracji decydują przede wszystkim własności fizyczne gleby: pojemność wodna, przepuszczalność, skład mechaniczny, struktura oraz grubość warstwy gleby. Ten wniosek nasuwa się na podstawie tak danych z literatury, jak również naszych prób. Przy użyciu cienkich warstw gleby w lejkach (tabela I i II) proces filtracji zależał od składu mechanicznego. Gleby o większej ilości części spławialnych lepiej oczyszczały zawiesinę *E. coli* aniżeli gleby o przewadze piasku. Natomiast przy zwiększaniu miąższości warstwy do 28 cm piasek filtrował dobrze, lepiej niż gleba o większej zawartości drobnych frakcji mechanicznych (tabela III).

Należy jednak zaznaczyć, że w tym wypadku gleba zachowała swoją naturalną strukturę gruzełkowatą. Dzięki temu odznaczała się większą przepuszczalnością, większą ilością por niekapilarnych niż piasek, przez które łatwiej przecieka woda z obecnymi w niej elementami żywymi. Potwierdza to fakt, że w tej kombinacji odciek następował momentalnie, prawie równocześnie z wlaniem wody czy ścieku do cylindrów.

Nawet w wypadku, kiedy gleba została pozbawiona makrostruktury, ale zachowała mikrostrukturę (tabela VI), *E coli* łatwiej przenikało do

odcieku niż po przejściu przez piasek. *Clostridium perfringens* w tych warunkach był zatrzymywany jednakowo przez glebę i przez piasek.

Na podstawie wykonanych prób nie udało się dostatecznie wyjaśnić wpływu stopnia uwilgotnienia gleby na proces filtrowania. Wydawało się, że gleba sucha, chłonąc wodę, powinna równocześnie zatrzymywać dużo bakterii. Natomiast gleba nasycona wodą będzie łatwiej przepuszczać wodę i wskutek tego oczyszczanie ścieku będzie słabsze. Tymczasem we wszystkich doświadczeniach, w których podlewano ściekiem gleby uprzednio nasycone wodą, uzyskiwano odciek o mianie *coli* i *perfringens* znacznie niższym niż w ścieku. Próbki gleby powietrznie suchej podlane od razu ściekiem lub mieszaniną wody ze ściekiem łatwiej przepuszczały bakterie. Przypuszczalnie zjawisko to związane było z kompleksem sorpcyjnym i jego stanem fizycznym w glebie suchej i wilgotnej.

Ilość bakterii w odcieku uzależniona była również od ilości ścieku. Gleby nadmiernie obciążone przestają prawdopodobnie spełniać rolę filtrów bakteryjnych. Zresztą nie tylko wysokość dawki ścieku ale także częstość podlewania ma znaczenie. W doświadczeniu I obserwowano wzrost miana *coli* w odcieku w miarę doprowadzania ścieku w krótkich odstępach czasu. Natomiast w doświadczeniu II i III, przy kilkutygodniowych odstępach pomiędzy kolejnym podlewaniem, miano *coli* i *perfringens* utrzymywało się prawie na równym poziomie.

W doświadczeniu I zwrócono uwagę na wysokość miana *coli* w odcieku z piasku, co nasunęło przypuszczenie o możliwości wypłukiwania z gleby bakterii pochodzenia zarówno glebowego jak i ściekowego. Zalewanie gleb wodą powodowało przechodzenie do odcieku *E. coli* zwłaszcza z gleb, które uprzednio słabo filtrowały ściek. Natomiast z gleb dobrze filtrujących woda nie usuwała bakterii. *Cl. perfringens* było trudno wypłukać wodą.

Reasumując wyniki można powiedzieć, że ściek miejski przepuszczony przez warstwę gleby zostaje uwolniony od *E. coli* i *Cl. perfringens* w mniejszym lub większym stopniu zależnie od szeregu czynników:

1) Grubości warstwy gleby; nawet warstwa o 5 cm grubości zatrzymywała pewną ilość *E. coli* i *Cl. perfringens*; przy zwiększeniu grubości do 28 cm filtrowanie stawało się dokładniejsze: miano *coli* i *perfringens* spadało do 0,1.

2) Struktury gleby; gleby bezstrukturalne (o układzie luźnym) na ogół lepiej filtrowały ściek niż gleby posiadające strukturę gruzełkową.

3) Składu mechanicznego; filtrowanie w glebach luźno ułożonych zależało od składu mechanicznego; przy większej zawartości części spławialnych mniej bakterii przechodziło do odcieku.

4) Ilości ścieku i częstotliwości podlewania; przy częstym podlewaniu (co kilka dni) i podwyższaniu dawki, gleba przestawała filtrować. Przy

podlewaniu w odstępach kilkutygodniowych miano *coli* i *perfringens* w odcieku nie ulegało zmianie.

5) Wilgotności gleby; gleba wilgotna zatrzymywała *E. coli* i *Cl. perfringens* lepiej niż gleba powietrznie sucha.

6) Zalewania wodą; *E. coli* i *Cl. perfringens* zatrzymane przez glebę na ogół trudno było wypłukać wodą. Wypłukiwanie miało miejsce tylko w glebach, które od razu przy podlewaniu ściekiem przepuszczały dużo bakterii do odcieku.

LITERATURA

Balicka N., Sobieszczański J., 1956: Żywotność *Escherichia coli* w glebie nawadnianej ściekiem miejskim, *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 207.

Hampl J., 1952: Microbiologicka prirucka. Praha.

Mochman H., 1955: Das Abwasser als Infektionsquelle, *Wasserwirtschaft Technik*, **6**: 187.

Paluch J., Radecka S., Filipowicz, J., 1957: Stan bakteriologiczny wód górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach, *Acta Microbiol. Polon.* **6**: 29.

Popp L., Bahr H., Gornanhdt H. J., 1955: Bakteriologische Studien in einem Abwasserverregnungsgebiet, *Wasser und Wirtschaft*, **2**: 41.

Przesmycki F., 1951: Zarys bakteriologii praktycznej, Warszawa, PZWL.

Sobieszczański J.: Żywotność *Clostridium perfringens* w glebie (nieopublikowane).

Tec W. I., 1955: Bakteriologia sanitarna, Warszawa PZWL.

Wierzbicki J., 1952: Działanie wód ściekowych na glebę. Wrocław.

N. Balicka und *J. Sobieszczański*

DER BODEN ALS BAKTERIENFILTER BEI DER LANDWIRTSCHAFTLICHEN VERWERTUNG DER STÄDTISCHEN ABWÄSSER

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit, wurde die Eignung des Bodens zum Filtrieren der städtlichen Abwässer, abhängig von folgendem Faktoren geprüft:

1) der mechanischen Zusammensetzung und der Struktur des Bodens,
2) der Dicke der Bodenschicht,
3) der Feuchtigkeit des Bodens und der Menge des eingeleiteten Abwassers.
4) der nachfolgenden Bewässerung.

Die Forschungen wurden im Laboratorium an in metallenen Zylindern befindlichen Bodenproben durchgeführt, sowie an solchen vom Felde entnommenen, denen mit Hilfe eines eigens dazu konstrurierten Apparates ihre natürliche Struktur erhalten blieb.

Der Bereinigungsgrad der Abwässer wurde auf Grund der Colititers sowie der Perfringenstiter festgestellt.

Die erzielten Forschungsergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden.

1) Bei Verwendung dünnerer Bodenschichten (ca 5 cm) erhielt man eine teilweise Bereinigung der Abwässer bei Verdickung der Schicht bis zu 28 cm wurde das Filtrieren genauer; der Colititer im Abwasser sank nach der Filtrierung durch die Bodenschicht von 0,00001 — 0,000001 auf 0,1 und der Perfringenstiter von 0,0001 — 0,001 auf 0,1.

2) Die Böden mit lockerer Struktur filtrierten im Allgemeinen die Abwässer besser als die Böden mit klumpiger Struktur,

3) Der Verlauf der Filtrierung war bei Böden mit lockerer Struktur abhängig von ihrer mechanischen Zusammensetzung; bei grösserem Gehalt von Schwemmteilchen gelangten weniger Bakterien zum Abfluss.

4) Bei häufiger Berieselung (alle paar Tage) und Erhöhung der Abwassermengen, hörte das Filtrieren durch den Boden auf; bei Berieselung in Abständen von ein paar Wochen, war die Filtrierung gut,

5) Der feuchte Boden den *E. coli* sowie die *Cl. perfringens* besser als der lufttrockene Boden.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 289-292

N. Balicka i *J. Sobieszczański*

WPŁYW GLEBY NA *ESCHERICHIA COLI* WPROWADZONE ZE ŚCIEKIEM

(DONIESIENIE)

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej
we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 14 czerwca 1957 r.

Komórki *E. coli* wprowadzone do gleby wraz ze ściekiem dostają się w środowisko dla nich obce i dlatego też przeważnie po pewnym czasie giną. Okres ten może trwać od kilku tygodni do kilku miesięcy, zależnie od tego, jak kształtują się warunki siedliska glebowego.

Przypuszczalnie przyczyny obumierania *E. coli* mogą być różne, zarówno fizyczne, chemiczne jak i biologiczne. Sorbcja bakterii, brak odpowiednich składników pokarmowych, antagonistyczne oddziaływanie zespołów mikroflory gleby oraz systemu korzeniowego roślin mogą stanowić czynniki przyśpieszające eliminację tych bakterii.

W rozpoczętej pracy badano oddziaływanie różnych gleb oraz korzeni niektórych roślin wraz z mikroflorą korzeniową na *E. coli*. Do wstępnych badań wybrano trzy rodzaje gleb: piasek, glebę próchniczną, madę średnią.

Gleby te umieszczano w wazonach doświadczalnych. Wilgotność gleby regulowano na poziomie około 60% pojemności wodnej.

Próby przeprowadzono 4 razy, w okresie od 19 do 27. IV. 1956 r., używając do tego celu pożywki bulionowej z glikozą zestalonej agarem. Powierzchnię pożywki w płytkach Petriego zasiewano gęstą zawiesiną *E. coli*, w celu uzyskania zlanego wzrostu, a następnie na powierzchni agaru układano 25 gruzełków badanej gleby. Ilość równoległych powtórzeń — 3. Temperatura hodowli 28°. Wyniki odczytywano po 1, 2, 3 i 5 dniach hodowli.

Równocześnie badano glebę sztucznie zmodyfikowaną: 2 części piasku i 1 część gleby próchnicznej, ogrodowej. Glebę nasypano do 6 wazonów

doświadczalnych, a następnie połowę z nich zasiano kupkówką, resztę zostawiono bez roślin.

Uzyskane wyniki są przedstawione w tabeli I.

Tabela I

Ilość gruzełków, dookoła których brak wzrostu *E. coli* w %

Lp.	Gleba	Ilość dni hodowli			
		1	2	3	5
1	Piasek	1	7	11	13
2	Próchniczna	13	36	73	83
3	Mada średnia	0	7	55	62
4	Piasek + gleba zasiana	5	15	40	68
5	Piasek + gleba bez roślin	4	11	30	60

Porównując trzy różne gleby (1 - 3), widzimy, że piasek wykazał najmniejszy procent gruzełków, dookoła których było brak wzrostu *E. coli*, natomiast najsilniejsze hamowanie jej rozwoju powodowała gleba próchniczna. Gleba stanowiąca mieszaninę piasku i gleby ogrodowej zajęła miejsce pomiędzy piaskiem a madą. Gleba obsiana hamowała wzrost *E. coli* nieco silniej, ale różnica ta nie była znamienna.

Równocześnie kontrolowano wysokość miana *coli* w glebie, w ciągu 2 miesięcy od momentu podlania wazonów ściekiem (tabela II). Miano *coli* oznaczano w pożywce płynnej Buliřa.

Tabela II

Miano *coli* w glebie

L. p.	Gleba	Przed podlaniem 27. II	Po podlaniu				
			28. II	5. III	29. III	22. IV	29. IV
1	Piasek	0,1	0,0001	0,001	0,001	0,1	0,1
2	Próchniczna	0,01	0,00001	0,0001	0,001	0,001	0,01
3	Mada średnia	0,01	0,00001	0,0001	0,0001	0,001	0,01
4	Piasek + gleba zasiana	0,01	0,0001	0,0001	0,001	0,01	0,01
5	Piasek + gleba bez roślin	0,01	0,0001	0,001	0,001	0,01	0,01

Z przytoczonych liczb wynika, że ilość komórek *E. coli* w piasku zmniejszała się szybciej niż w glebie próchnicznej, pomimo jego słabszej

„aktywności antagonistycznej". Możliwe, że w piasku przyczyną tego były niesprzyjające warunki fizyczne oraz brak substancji organicznej.

Fakt ten nasuwa myśl, że przyczyny obumierania *E. coli* w różnych glebach są niejednakowe. Szybkość zanikania *E. coli* będzie prawdopodobnie zależna też od natężenia czynnika decydującego w poszczególnych przypadkach i dlatego trudno będzie określić, w których glebach *E. coli* zanika szybciej, a w których wolniej.

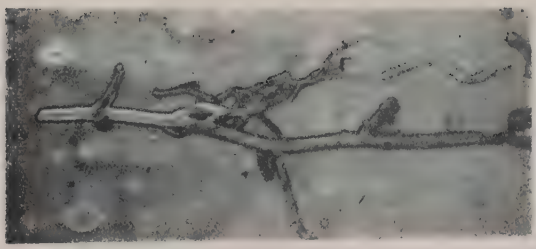
Tabela III

Hamowanie wzrostu E. coli przez korzenie różnych roślin na podłożu agarowym

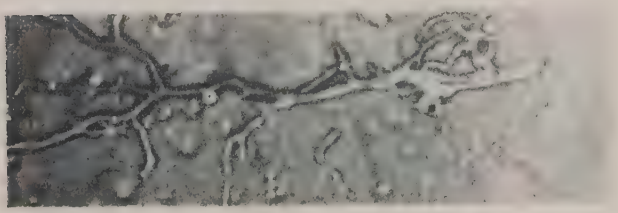
Roślina	Ilość próbek korzeni			
	hamujących	pora roku w której pobrano korzenie	nie hamujących	pora roku w której pobrano korzonki
Trifolium pratense Koniczyna czerwona	9	wiosna, lato jesień	0	
Sinapis alba Gorczyca	3	wiosna	0	
Secale cereale Żyto	3	wiosna, lato	0	
Phleum pratense Tymotka	1	wiosna	3	wiosna, jesień
Dactylis glomerata Kupkówka	2	wiosna, lato	2	wiosna, lato
Poa pratensis Wiechlina łąkowa	5	wiosna, lato jesień	1	jesień
Agropyrum repens Perz	1	wiosna	2	lato
Rumex acetosella Szczaw zajęczy	2	wiosna	0	
Matricaria chamomilla Rumianek psi	2	wiosna	0	
Capsella bursa pastoris Tasznik	2	wiosna	0	
Plantago major Babka średnia	2	wiosna	0	
Sonchus arvensis Mlecz polny	2	wiosna	0	
Senecio vulgaris Starzec pospolity	1	wiosna	0	
Galinsoga parviflora Żółtlica pospolita	1	wiosna	0	
Chenopodium album Lebioda	1	wiosna	1	jesień

Dane z literatury sugerują, że poważnym czynnikiem przyśpieszającym obumieranie *E. coli* w glebie są korzenie roślin i mikroflora korzeniowa. Badania nad tym zagadnieniem rozpoczęliśmy następującą próbą: na powierzchni agaru z glikozą wysiewano gęstą zawiesinę *E. coli*, a następnie układano korzonki różnych roślin otrząśnięte z gleby. Korzenie brano od roślin młodych w okresie wschodów i starszych kwitnących lub podczas dojrzewania nasion. Uwzględniono 17 roślin z pośród gatunków uprawnych i chwastów. Uzyskane wyniki podano w tabeli III.

Stosunek korzeni poszczególnych roślin do *E. coli* na pożywce agarowej był różny. Dookoła np. korzonków koniczyny stale powstawały strefy zahamowań wzrostu *E. coli*, natomiast wpływ korzeni innych roślin był różny (fot. 1, 2 i 3). Wydaje się, że pewne znaczenie miał wiek rośliny. Przyczyna braku wzrostu *E. coli* w pobliżu korzeni może polegać na antagonistycznym oddziaływaniu mikroflory korzeniowej, a może też zależeć od samych korzeni, np. zakwaszenie środowiska, lub innych przyczyn, których wyjaśnienie jest zamierzone w dalszej pracy.



Fot. 1. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni koniczyny



Fot. 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni gorczycy

Fot. 3. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni żyta

1957, 6, 293-302
ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

A. Nowakowska

AUTOLIZA DROŻDŻY BROWARNICZYCH I PIEKARNIANYCH

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

Wpłynęło dnia 18 lutego 1957 r.

Autolizę drożdży uważa się za proces pośmiertny, podczas którego komórki ulegają czynnej autofermentacji.

W komórkach zawierających glikogen czy tłuszcz, w początkowych godzinach autolizy zachodzi przejściowo fermentacja, która jednak na skutek rozłożenia enzymów i wyczerpania zapasów szybko ustaje. Podczas właściwej autolizy aktywne są enzymy proteolityczne, rozkładające nagromadzone w plazmie białka do rozpuszczalnych polipeptydów i aminokwasów. Mechanizm tych procesów nie jest jeszcze dokładnie poznany. Hecht i Civin (1936) przypuszczają, że pepsyna (przy *pH* 1,8) i trypsyna (przy *pH* 7,8) hydrolizują proteiny drożdżowe do polipeptydów, z których potem erepsyna w połączeniu z peptydazą odłączają końcowe grupy aminokwasów. Według prac Straina (1939) enzymy proteolityczne drożdży występują w połączeniu z nierozpuszczalnymi białkami i podczas autolizy nie przechodzą do roztworu. Podaje on również, że proteazy drożdżowe nie należą do typu papain, ponieważ substancje utleniające te ostatnie nie paraliżują autolizy.

Podczas autolizy błona komórkowa nie podlega działaniu enzymów i komórki zachowują swój normalny kształt. Stwierdza to Goetz i Goetz (1938), Strain (1939) i ostatnio Houwink i Kreger (1953) przy pomocy mikroskopu elektronowego oraz na podstawie badań mikrochemicznych.

Autolizowane drożdże nie barwią się błękitem metylenowym, co wskazuje na ich redukujące własności w stosunku do tego barwika. W autolizowanych komórkach zachodzą zmiany przy barwieniu metodą Grama. Stacey i Webb (1948) przypuszczają, że podczas autolizy gramdodatnich drobnoustrojów zmiana ta poprzedza lizę, w której dzięki czynności ribonukleazy zostaje rozerwane wiązanie między kwasem rybonukleinowym a polisacharydem. Lamanna i Mallette (1950)

donoszą, że komórki drożdżowe są gramdodatnie z powodu obecności ribonukleinianów. Nie udowodniono jednak, że odłączenie kwasu nukleinowego musi wpływać na zmianę w barwieniu.

W czasie autolizy nad osadem drożdży zbiera się ekstrakt zwany autolizatem, o charakterystycznym grzybowo-mięsnym zapachu, koloru od jasnożółtego do ciemnobrązowego, zależnie od rodzaju użytych drożdży i czasu trwania autolizy. Na początku procesu, obok związków pochodzenia białkowego uwalniane są również kwasy nukleinowe, węglowodany, fosforany i witaminy drożdżowe. Ze względu na tak bogatą zawartość autolizaty są szeroko rozpowszechnione w pracowniach mikrobiologicznych jako dodatek do różnych środowisk hodowlanych, a w ostatnich latach znajdują coraz szersze zastosowanie w przemyśle fermentacyjnym i spożywczym.

BADANIA WŁASNE

Pracę podjęto w celu otrzymania autolizatów z pofermentacyjnych drożdży browarniczych, które są usuwane z kadzi w ilości około 1 kg na 1 hl piwa i zawierają od 50 do 60% białka w suchej substancji (Gołębiowski, 1955). Drożdże te poza nielicznymi wyjątkami nie są wykorzystywane.

W badaniu uwzględniono następujące zagadnienia:

1) Wpływ przemywania masy drożdżowej wodą na straty komórkowych związków azotowych,

2) Przebieg autolizy w ciągu 96 godzin,

3) Wpływ dodatku toluenu i 0,75% chlorku sodu na przechodzenie suchej substancji i związków azotowych do roztworu,

4) Wpływ rozcieńczenia gęstwy drożdżowej na zawartość azotu w autolizacie.

Do badań użyto drożdży fermentacji dolnej pochodzących z browaru nr 1 w Łodzi. Są one ciemnej barwy i gorzkie w smaku, z powodu zanieczyszczeń pochodzących z chmielu i brzeczki. W celu usunięcia tych zanieczyszczeń przemywano drożdże bieżącą wodą na sicie włosianym a następnie poddawano autolizie. Równocześnie sporządzano autolizaty ze świeżych drożdży piekarnianych celem porównania ich z autolizatami drożdży browarniczych. Zawartość suchej masy, azotu ogólnego i aminowego w użytych drożdżach i ich autolizatach została podana w tabeli I.

Ilość kwasów goryczkowych i żywic w drożdżach browarniczych wynosiła 0,09% w suchej substancji, czyli 0,014% w gęstwie drożdżowej. Kontrola mikroskopowa drożdży wykazała zakażenie bakteryjne dochodzące do 10% w stosunku do ilości komórek *Saccharomyces cerevisiae*. Ilość komórek zawierających glikogen wahała się od 0 do 10%, a ilość komórek martwych od 1 do 4%.

Tabela I

Zawartość suchej substancji i azotu ogólnego w drożdżach i autolizatach
Contents of dry mass and of total nitrogen in yeasts and autolysates

Drożdże browarnicze Brewery yeasts			Autolizaty Autolysates			
Sucha masa w % % Dry mass in % %	% N-ogólnego % N-total w suchej masie in dry mass	% N-ogólnego % N-total w zawiesinie in suspension	Sucha masa w % % Dry mass in % %	% N-ogólnego % N-total w suchej masie in dry mass	% N-ogólnego % N-total w roztworze in solution	N ogólny autolizatu / N ogólny drożdży × 100 N total in autolysates / N total in yeasts
16,00	9,02	1,44	—	—	1,18	80,50
14,00	10,10	1,41	—	—	1,19	84,40
11,50	9,30	1,08	8,35	11,02	0,92	85,20
14,80	10,40	1,54	10,60	11,41	1,21	78,60
16,23	10,50	1,70	11,47	13,08	1,50	88,20
16,50	10,50	1,755	11,85	12,90	1,52	87,80
17,75	9,30	1,50	11,50	11,13	1,28	85,30
17,70	9,90	1,755	12,03	12,72	1,53	87,40
—	—	1,70	12,70	11,40	1,45	85,60
Drożdże piekarniane Backers yeasts			Autolizat Autolisate			
21,66	6,47	1,36	10,91	8,25	0,90	66,18
16,00	6,60	1,05	6,23	10,76	0,67	63,80
30,00	7,10	2,13	12,20	11,23	1,36	64,00

Autolizę przeprowadzano w temperaturze 49° w ciągu 48 godzin w kolbach zakrytych korkiem z waty, przy czym *pH* dla drożdży browarniczych wynosiło średnio 6,0 a dla piekarnianych 5,5.

W drożdżach i autolizatach oznaczano: suchą substancję, azot ogólny metodą Kjeldahla i azot aminowy metodą Van Slyke'a.

Zawartość kwasów goryczkowych i żywic oznaczano przez ekstrakcję eterem naftowym w aparacie Soxhletta w ciągu 10 godzin (B u ł h a k o w 1947). Ilość tych substancji w autolizatach określano z różnicy ich w drożdżach przed autolizą i po autolizie, po dwukrotnym przepłukaniu drożdży na filtrze Büchnera.

W czasie doświadczeń zauważono, że autoliza drożdży zawierających około 1% komórek z glikogenem przebiegała ze słabymi oznakami fermentacji. Gdy ilość ta przekroczyła 10%, autolizie towarzyszyło wydzielanie gazów, powodujące pienienie się gęstwy drożdżowej w początkowych godzinach procesu. W tym wypadku dodatek toluenu, który zabijał komórki bez uszkodzenia enzymów proteolitycznych, hamował fermentację.

Drożdże zawierające do 83% wilgoci w ciągu 48 godzin nie ulegały prawidłowej autolizie, ale przy wyższej zawartości wody niektóre próby ulegały zakażeniu bakteriami gnilnymi. W tych warunkach prawidłowy przebieg procesu osiągnięto również po dodaniu toluenu.

Po skończonej autolizie z nad osadu drożdży zlewano ekstrakt, który następnie klarowano za pomocą filtru G_5.

WPŁYW PRZEMYWANIA MASY DROŻDŻOWEJ WODĄ

Wpływ przemywania badano, zadając masę drożdżową, przemytą 1 raz na sicie sześciokrotną objętością wody, którą zmieniano 6 razy w ciągu 48 godzin. Dla porównania analogiczne doświadczenia wykonano z drożdżami piekarnianymi, przedłużając czas przemywania do 72 godzin. W uzyskanej masie drożdżowej oznaczano ilość azotu (tabela II).

Tabela II

Wpływ przemywania drożdży na zawartość N ogólnego w suchej masie w %
The effect of washing on the total nitrogen contents in yeasts cells

Drożdże browarnicze Brewery yeasts	Zawartość N-ogólnego w suchej masie w % Contents of total N in dry mass in per cents
Po pierwszym myciu — 1-st washing	9,45
Przemywanie 3× w ciągu 24 godzin Washed 3-times during 24 hours	10,16
Przemywanie 6× w ciągu 48 godzin Washed 6-times during 48 hours	10,44
Drożdże piekarniane Backers yeasts	
Po pierwszym myciu — 1-st washing	7,31
Przemywanie 3× w ciągu 24 godzin Washed 3-times during 24 hours	7.62
Przemywanie 6× w ciągu 48 godzin Washed 6-times during 48 hours	6,81
Przemywanie 8× w ciągu 72 godzin Washed 8-times during 72 hours	6,81

Po upływie 24 godzin, na skutek dokładniejszego wymycia komórek, wzrasta zawartość azotu. W drożdżach piekarnianych po 48 godzinach widać wyraźny spadek azotu; poziom ten nie zmienia się po 72 godzinach przemywania, natomiast w drożdżach browarniczych nawet po 48-godzinnym przemywaniu nie stwierdzono ubytku substancji azotowych z powodu dalszego wymywania komórek.

Przed sporządzaniem autolizatów drożdże browarnicze odgoryczano przez kilkakrotne przemycie wodą wodociągową w ciągu 24 godzin. Użycie

zwykłej wody zamiast powszechnie stosowanej wody alkalicznej było spowodowane obawą przed stratami witaminów i azotu. W następnych doświadczeniach nie odgoryczano drożdży, gdyż okazało się, że tylko niewiele substancji goryczkowych przechodzi do roztworu w warunkach autolizy. Gotowy produkt zawierał ich tylko 0,00019%.

WPŁYW CZASU NA AUTOLIZĘ

W tym doświadczeniu używano drożdży browarniczych, zawierających 16,5% suchej substancji i 1,7% azotu ogólnego, oraz drożdży piekarnianych o zawartości 16,0% suchej substancji i 1,05% azotu. Autolizę przeprowadzono w ciągu 96 godzin i w odstępach dobowych oznaczano w roztworze: suchą substancję, azot ogólny i azot aminowy. Średnie wyniki z dwu powtórzeń dla obu rodzajów drożdży zebrane są na wykresie 1.

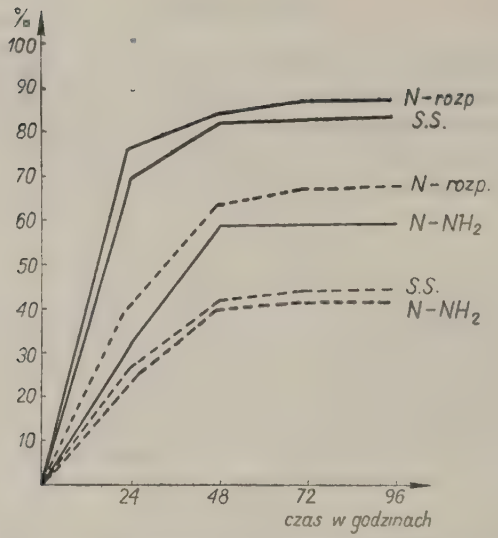
Z doświadczeń wynika, że: 1) autoliza jest ukończona już po 48 godzinach, 2) z drożdży browarniczych uzyskuje się o 20% wyższą wydajność azotu rozpuszczalnego niż z piekarnianych. Drożdże browarnicze są więc bardziej podatne na działanie enzymów proteolitycznych, co wykazali również w swoich pracach Vosti i Joslyn (1954). Z drugiej strony pewne zwiększenie ilości azotu rozpuszczalnego w stosunku do ilości azotu ogólnego obserwowane w drożdżach browarniczych może być spowodowane obecnością zanieczyszczeń o małej zawartości azotu, które nie przechodzą do autolizatu.

WPŁYW TOLUENU I CHLORKU SODU

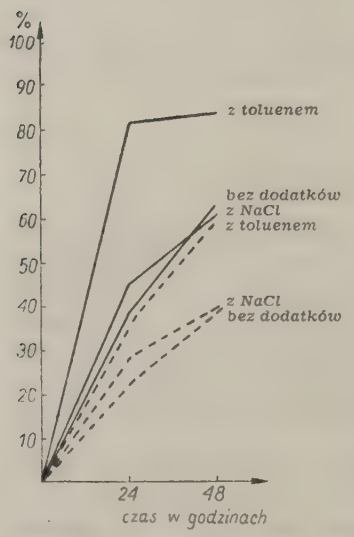
Drożdże o wyżej wymienionych zawartościach suchej substancji i azotu ogólnego autolizowano: a) bez żadnych dodatków, b) z dodatkiem 0,75% chlorku sodu, c) po dodaniu toluenu pokrywającego powierzchnię warstwą grubości od 1 do 2 mm, d) z dodatkiem toluenu i chlorku sodu. W autolizatach po 24 i 48 godzinach oznaczano suchą substancję, azot ogólny i aminowy, oraz białkowy wytrącalny kwasem trójchlorooctowym. W żadnej próbce nie stwierdzono azotu białkowego. W tabeli III zebrano średnie wyniki dwu prób równoległych.

Autolizę drożdży piekarnianych ilustruje wykres 2, z którego widać, że w obecności toluenu zwiększyła się zawartość suchej substancji oraz azotu ogólnego i aminowego. Dodatek chlorku sodu nieznacznie przyśpieszył autolizę, ale nie zmienił ostatecznie wyników (wykres 3).

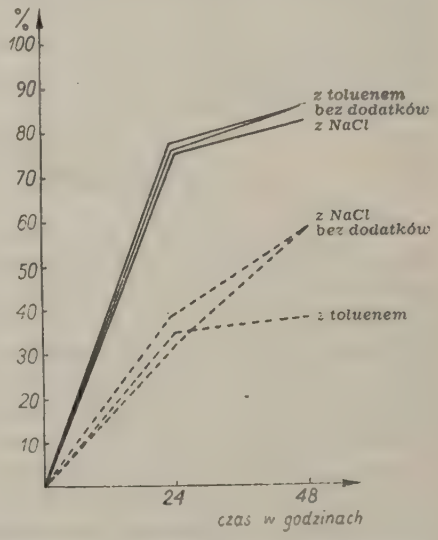
W wypadku drożdży browarniczych (wykres 3) toluen i chlorek sodu nie wpływał na wydzielanie azotu ogólnego i suchej substancji. Toluen jednak obniżał ilość azotu aminowego, wykazując własności hamujące w stosunku do peptydazy.



Wykres 1. Autoliza drożdży browarniczych i piekarnianych w ciągu 96 godzin.
Fig. 1. Autolysis of brewery and bakers yeasts during 96 hours



Wykres 2. Autoliza drożdży piekarnianych z dodatkiem toluenu, 0,75% NaCl i bez dodatków.
Fig. 2. Autolysis of bakers yeasts alone and in presence of toluen or 0,75% of NaCl.



Wykres 3. Autoliza drożdży browarniczych bez dodatków, z dodatkiem 0,75% NaCl i toluenu
Fig. 3. Autolysis of brewery yeasts alone and in presence of toluen or 0,75% NaCl.

Tabela III

Wpływ dodatku toluenu i chlorku sodu na autolizę drożdży
Effect of toluen and natrium chloride on yeast autolysis

Drożdże — yeast	Autolizaty — Autolysates					
	Sucha masa w % Dry mass in %		N ogólny w % N total in %		$N—NH_2$ w % $N—NH_2$ in %	
	24	48	24	48	24	48 godzin hours
Drożdże browarnicze — brewery yeast						
bez dodatków — alone	10,48	12,70	1,30	1,45	0,55	1,00
+ 0,75% NaCl	11,44	13,34	1,30	1,40	0,66	1,00
+ toluen	10,76	13,03	1,33	1,45	0,60	0,65
+ NaCl i toluen	10,44	13,60	1,34	1,44	0,67	0,90
Drożdże piekarniane — bakers yeast						
bez dodatków — alone	4,14	6,23	0,42	0,67	0,24	0,42
+ 0,75% NaCl	6,28	7,04	0,47	0,65	0,32	0,42
+ toluen	7,17	9,50	0,86	0,88	0,42	0.64

WPŁYW ROZCIEŃCZENIA GĘSTWY DROŻDŻOWEJ WODĄ

W czasie dokonywania doświadczeń okazało się, że drożdże o stosunkowo małej zawartości wody (nie dochodzącej do 83%) podczas 48-godzinnej autolizy nie ulegają zakażeniom mikrobiologicznym. Gotowy autolizat o mniejszej zawartości wody był również bardzo odporny na zakażenie (Nowakowska 1957). Z tych powodów drożdże autolizowane bez dodatku antyseptyku powinny mieć odpowiednio uregulowaną zawartość wody. Zbadano, czy ilość wody zawartej w drożdżach autolizowanych ma pływ na uwalnianie azotu rozpuszczalnego.

W tym celu drożdże browarnicze przemyto jeden raz na sicie i odsączono na filtrze Büchnera do zawartości 80% wody. Masę tę zawierającą 1,84% azotu rozcieńczano wodą sterylną do poziomu 85,0, 88,5, 90,0, 92,5% wody i autolizowano w sterylnych naczyniach. W badanym materiale po 43 godzinach oznaczano zawartość azotu rozpuszczalnego. W tabeli IV zebrano średnie wyniki z dwu powtórzeń.

Jak widać, mimo ciągłego zmniejszania azotu ogólnego w drożdżach na skutek dodawania wody, stosunek azotu rozpuszczalnego do ogólnego nie ulegał większym zmianom. Pewne wahania można wytłumaczyć niejednolitością surowca, jaki stanowią zanieczyszczone, pofermentacyjne drożdże browarnicze. Według prac Straina (1939) oraz Vosti i Jos-

Tabela IV

Wpływ rozcieńczenia drożdży browarniczych na zawartość azotu w autolizacie
Effect of dilution on nitrogen content in autolysate

Zawartość wody w % Water content in %	Zawartość N ogólnego w % N total content in %	$\frac{\text{N ogólny autolizatu}}{\text{N ogólny drożdży}} \times 100$ $\frac{\text{N total in autolysate}}{\text{N total in yeast cells}} \times 100$
80,0	1,50	76,40
85,0	1,41	77,38
88,5	1,08	74,07
90,0	0,94	77,66
92,5	0,70	74,00

lyn (1954 b) ilość wody w zawiesinie drożdży piekarnianych również nie miała wpływu na wydzielanie azotu do autolizatu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przedstawionej pracy uwzględniono zagadnienia mogące mieć znaczenie dla produkcji autolizatów z pofermentacyjnych drożdży browarniczych na skalę techniczną.

Jørgensen (1948), Orla-Jensen (1942) oraz wielu innych autorów zaleca przeprowadzanie autolizy w temperaturze 50°. Drews (1936), Vosti i Joslyn (1954 a) podają temperaturę 45° jako optymalną dla autolizy drożdży piekarnianych, przy czym różnica między wydajnością azotu rozpuszczalnego otrzymaną w temperaturze 45° i 55° jest według nich nieduża i nie sięga 6%. W pracy niniejszej stosowano temperaturę 49°, jako hamującą rozwój wielu szczepów drobnoustrojów, co w warunkach technicznych jest szczególnie ważne. Autoliza, jak każdy proces enzymatyczny, jest w dużej mierze zależna od *pH* środowiska. Dernby (według Drews, 1936) podaje, że optymalne *pH* jest różne dla poszczególnych enzymów proteolitycznych drożdży, a dla łącznego ich działania przyjmuje jako optimum *pH* 6,0. Według prac Drews (1936) i Vosti i Joslyn (1954 a) największą wydajność azotu rozpuszczalnego i fosforu z drożdży piekarnianych otrzymuje się przy *pH* 4,4, a z browarniczych w czystej kulturze przy *pH* 5,0. Mimo pewnych różnic w stężeniu jonów wodorowych wydajności azotu rozpuszczalnego otrzymane w obecnej pracy kształtują się na tym samym poziomie, a w niektórych wypadkach są nieco wyższe.

Czas trwania autolizy jest różnie szacowany w literaturze, ale wszyscy badacze podają pierwszą dobę jako okres najintensywniejszego wydzielania azotu i fosforu. Orla-Jensen (1942) stosuje autolizę 24-go-

dzinną, ale Vosti i Joslyn (1954 a) obserwowali wydzielanie azotu jeszcze po 70 godzinach autolizy. Według Virtanena i Pentilla (1953), którzy przeprowadzali badania w ciągu 23 dni, istnieją trzy stadia autolizy drożdży browarniczych: 1) W ciągu jednego dnia — sucha substancja i azot gwałtownie przechodzą do roztworu, 2) Od 1 do 6,5 dnia — przerwa w uwalnianiu tych związków, 3) Od 6,5 do 8,5 dnia — badane związki znów przechodzą do roztworu.

W przedstawionej pracy stwierdzono również, że pierwsza doba jest okresem najintensywniejszego wydzielania azotu, a autoliza praktycznie jest już zakończona po 48 godzinach.

Haechn i Leopold (1935) podają, że toluen o wiele słabiej wpływa na przebieg autolizy drożdży niż inne antyseptyki. Według badań Vosti i Joslyn (1954 a) podczas autolizy drożdży piekarnianych w obecności toluenu zmniejsza się zawartość azotu aminowego o około 10%, ale ilość azotu ogólnego i fosforu w autolizacie pozostaje bez zmian. Według Virtanen i Pentilla (1953) przy autolizie drożdży piekarnianych i browarniczych z dodatkiem toluenu wybitnie wzrasta ilość azotu ogólnego i suchej substancji. U drożdży paszowych autolizowanych w tych samych warunkach widoczny jest wyraźny spadek ilości tych substancji. W obecnej pracy drożdże browarnicze wykazywały reakcję na dodatek toluenu podobną do zaobserwowanej u drożdży piekarnianych (Vosti i Joslyn, 1954). Drożdże piekarniane zachowały się podobnie jak browarnicze i piekarniane w pracy Virtanena i Pentilla (1953). Opierając się na tych wynikach, można wnioskować, że działanie toluenu zależy od gatunku oraz od warunków hodowli drożdży poddawanych autolizie.

* * *

1. Odgoryczanie drożdży browarniczych przez przemywanie wodą w ciągu 24 godzin nie powoduje zmniejszenia zawartości substancji azotowych w komórkach.

2. Autoliza drożdży browarniczych i piekarnianych przebiega niemal całkowicie w ciągu 48 godzin.

3. Z drożdży browarniczych po 48 godzinach autolizy otrzymuje się o około 20% większą wydajność azotu niż z piekarnianych.

4. Dodatek toluenu powoduje zwiększenie się o około 20% ilości azotu rozpuszczalnego i aminowego w autolizacie drożdży piekarnianych.

5. Dodatek toluenu powoduje zmniejszenie ilości azotu aminowego, a nie wpływa na zawartość azotu ogólnego w autolizacie drożdży browarniczych.

6. Ilość wody zawartej w gęstwie drożdżowej nie wpływa na uwalnianie związków azotowych w czasie autolizy.

LITERATURA

Bułhakow N., 1947: Chemiczno-Techniczna Kontrola Fabrykacji Piwa. tłum. z j. rosyjskiego, Bydgoszcz.

Drews B., 1936: Über die Autolyse einiger Kulturhefen. *Biochem. Z.* **288**: 207-237.

Goetz A., Goetz S., 1938: Vitrification a. crystallization of Protophyta at low temperatures. *Proc. Am. Phil. Soc.* **79**: 361-388.

Gołębiowski T., 1955: *Przemysł Spożywczy* **5**, 215.

Haechn H., Leopold H., 1935: Influence of antiseptics on yeast autolysis. *Wochschr. Brau.*, **51**: 353-356.

Hecht M., Civin H., 1936: Studies on enzyme action. I. The estimation of pepsin a. trypsin in yeast. *J. Biol. Chem.*, **116**: 477.

Houwink A., Kreger D., 1953: Observation on the cell wall of yeasts. An electron microscope and X-ray diffraction study. *Antonie van Leeuwenhoeck*, **19**: 1-24.

Jørgensen A., 1948: Microorganisms and Fermentation, 257, 523, London.

Lamanna C., Mallette M., 1950: The relation of the gram stain to the cell wall a. ribonucleic acid content of the cell.

Nowakowska A., 1957: Oporność autolizatów drożdżowych na zakażenia mikrobiologiczne. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 303.

Orla-Jensen S., 1952: The Lactic Acid Bacteria, 84, Kobenhavn.

Stacey M., Webb M., 1948: Some components of the lytic system of gram positive microorganisms. *Nature*, **151**: 671.

Strain H., 1939: Extraction of protein and proteolytic enzymes from yeast. *Enzymologia*, **7**: 133-141.

Virtanen E., Pentilla I., 1953: On the breakdown and solubilisation of nitrogen compounds in yeast autolysis. *VI Congr. Intern. Microbiol.* Roma. Vol. **III**, sezioni XVII-XXII s. 924.

Vosti D., Joslyn A., 1954: Autolysis of several pure cultures yeasts. *Appl. Microbiol.* **2**: 79.

Vosti D., Joslyn A., 1954 a: The autolysis of backers yeast. *Appl. Microbiol.* **2**: 70.

A. Nowakowska

AUTOLYSIS OF BREWERY AND BAKER'S YEASTS

Summary

Washing of yeasts during 24 hours did not influenced the nitrogen contents of cells.

The autolysis is completed after 48 hours of incubation.

The nitrogen content in brewery yeast autolysate is by 20 per cent higher than in bakers yeast autolysate.

The yield of soluble and amino nitrogen in bakers yeast autolysates was increased by 20 per cent in presence of toluen.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 303-307

A. Nowakowska

OPORNOŚĆ AUTOLIZATÓW DROŻDŻOWYCH NA ZAKAŻENIA MIKROBIOLOGICZNE

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

Wpłynęło 18 lutego 1957 r.

Powszechnie wiadomo, że autolizaty drożdżowe używane są w pracowniach mikrobiologicznych jako dodatki stymulujące wzrost wielu szczepów drobnoustrojów. W czasie prac nad otrzymywaniem autolizatów zauważono jednak, że niektóre próby o wyższej zawartości suchej substancji nie podlegają zakażeniom mikrobiologicznym, w przeciwieństwie do odpowiednich zawiesin drożdżowych (Nowakowska 1957).

W literaturze spotyka się liczne wzmianki o hamującym działaniu drożdży na wzrost innych mikroorganizmów. Orla-Jensen (1942) podaje, że paciorkowce chorobotwórcze nie rosną, gdy jedynym źródłem azotu w podłożu jest autolizat drożdżowy, tłumacząc, że azot z tego źródła jest nieodpowiedni dla rozwoju tych bakterii. Według Skorodumowej (1954) drożdże fermentujące węglowodany wydzielają podczas wzrostu substancje hamujące wzrost maczugowców błonicy. Prace Stöckli (1953) świadczą, że drożdże browarnicze, rosnące w hodowli mieszanej ze *Streptococcus cerevisiae*, hamują rozwój bakterii na skutek wyczerpania odżywczych substancji podłoża, a nie przez wydzielanie antybiotyków. O własnościach antybiotycznych ekstraktów drożdżowych wzmiankuje Parfentiev (1954), który stosował je *in vivo* przy leczeniu zakażeń powodowanych przez bakterie gramujemne.

Celem przedstawionej pracy było zbadanie oporności autolizatów drożdżowych na zakażenia mikrobiologiczne i możliwość przechowywania ich bez środków konserwujących.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Próby nad odpornością na zakażenie przeprowadzone były na autolizatach z pofermentacyjnych drożdży browarniczych i piekarnianych, wyjałowionych za pomocą filtru bakteriologicznego Berkefelda. Drożdże bro-

warnicze posiadały ciemną barwę i gorzki smak, z powodu zanieczyszczeń pochodzących z chmielu.

Autolizę przeprowadzano w temperaturze 49° w ciągu 48 godzin. Próbki otrzymanych w ten sposób autolizatów z drożdży browarniczych o *pH* około 5,8 zawierały: 21,5, 15,6 i 12,7% suchej substancji. Próbki autolizatów z drożdży piekarnianych o *pH* około 5,4 zawierały 22,1, 17,0 i 10,9% suchej substancji. Stężenia o niższej zawartości suchej substancji otrzymano przez odpowiednie rozcieńczenie gotowego autolizatu wodą sterylną, po uwzględnieniu jego gęstości, którą mierzono piknometrycznie.

Do badań wybrano drobnoustroje, które mogą przeprowadzać dalszy rozkład polipeptydów i aminokwasów. Przebadano bakterie proteolityczne tlenowe i beztlenowe, pałeczki z grupy *coli* oraz pleśnie. Wymienione szczepy pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej. Wysiane z hodowli rysowej kultury hodowano w probówkach w optymalnych dla nich temperaturach. Beztlenowce szczepiono po odpowietrzeniu podłoża, a następnie wewnątrz probówki umieszczano watę z pyrogallolem i 20-procentowym KOH, po czym zamykano je szczelnie gumowym korkiem.

Kontrolne próby pozostawione były w otwartych naczyniach w temperaturze pokojowej i w 30° w celu umożliwienia zakażenia drobnoustrojami z powietrza.

Do wysiewów używano autolizatów o *pH* oryginalnym oraz doprowadzonym do 6,0 za pomocą węglanu wapnia.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tabeli I i II podany jest wzrost drobnoustrojów na różnych stężeniach autolizatów z drożdży browarniczych i piekarnianych po 10 dniach. Doświadczenia były wykonywane w sześciu powtórzeniach dla każdego autolizatu. Otrzymane wyniki były zgodne we wszystkich próbach równoległych. Autolizaty z drożdży piekarnianych w odpowiednich stężeniach zachowały podobną oporność na zakażenie jak i autolizaty drożdży browarniczych, mimo że te ostatnie były zanieczyszczone substancjami pochodzenia chmielowego. Można stąd wnioskować, że substancje hamujące wzrost drobnoustrojów pochodzą tylko z komórek drożdżowych.

Obserwacje autolizatów, które nie uległy zakażeniu w ciągu 10 dni, przedłużono do sześciu miesięcy. Okazało się, że autolizaty zawierające 22,1 i 21,5% suchej substancji, przy badanych *pH* hamowały rozwój omawianych drobnoustrojów oraz nie podlegały zakażeniom. Pozostały one jałowe w ciągu sześciomiesięcznego czasu obserwacji.

Przy zawartości 15,6 i 17,0% suchej substancji rozwijały się w autolizatach tylko pleśnie i to z kilkutygodniowym opóźnieniem.

Wszystkie próbki autolizatów zawierających nie więcej niż 12,7% suchej substancji narażone na zakażenie ulegały zakażeniu drobnoustrojami z otoczenia przez pałeczki, ziarniaki, drożdże rodzaju *Torula* oraz pleśnie.

Próby o zawartości około 1,5% suchej substancji w temperaturze pokojowej ulegały spontanicznemu zakażeniu przez przetrwalnikujące tlenowce już w ciągu kilku godzin.

W autolizatach o *pH* 5,4 działało hamująco na rozwój wymienionych bakterii również *pH* środowiska.

Tabela I

Wzrost drobnoustrojów po 10 dniach na autolizatach z drożdży browarniczych o *pH* 5,8 i 6,0
Growth of various microorganisms after 10 days of incubation in brewery yeast autolysates, *pH* 5,8 and 6,0

Szczep badany Strain examined	Procentowa zawartość suchej substancji w autolizatach Concentration of dry mass in autolysates per cent							
	21,5	15,6	12,7	11,9	10,56	9,25	7,9	6,5
Proteus vulgaris	—	—	+	+	+	+	+	+
Pseudomonas fluorescens	—	—	—	+	+	+	+	+
Serratia marcescens	—	—	+	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	—	—	—	—	—	—	+	+
Bacillus megatherium	—	—	—	—	—	+	+	+
Bacillus mycoides	—	—	—	—	—	—	—	+
Clostridium putryficum	—	—	—	—	+	+	+	+
Clostridium botulinum	—	—	—	—	—	—	+	+
*Escherichia coli 2.**	—	—	—	+	+	+	+	+
Escherichia coli ATCC 9294	—	—	+	+	+	+	+	+
Aspergillus niger	—	—	+	+	+	+	+	+
Penicillium glaucum	—	+**	+	+	+	+	+	+
Próbka wystawiona na samozakażenie w temperaturze pokojowej i w 30° Infection of the sample from air in room temperature and at 30°	Wszystkie próbki uległy zakażeniu All samples infected							

\+ widoczny wzrost — visible growth
— brak wzrostu — no growth
* Szczep *E. coli 2.* nie wytwarza indolu
** Wzrost nastąpił po kilku tygodniach — growth observed after few weeks

Tabela II

Wzrost drobnoustrojów po 10 dniach na autolizatach z drożdży piekarnianych o *pH* 5,4 i 6,0

Growth of various microorganisms after 10 days of incubation in yeast autolysates, *pH* 5,4 and 6,0

Szczep badany	Procentowa zawartość suchej substancji w autolizatach Concentration of dry mass in autolysates per cent									
	22,1	17,0	10,9	10,1	9,0	7,9	6,8	5,6	4,5	3,1
	pH — 5,4									
Proteus vulgaris	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Pseudomonas fluorescens	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Serratia marcescens	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Bacillus subtilis	—	—	—	—	—	—	—	—	-	+
Bacillus megatherium	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Bacillus mycoides	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Clostridium putryficum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Clostridium botulinum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Escherichia coli 2.	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Escherichia coli ATCC 9294	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Aspergillus niger	—	+*	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicillium glaucum	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Próbka wystawiona na samozakażenie w temperaturze pokojowej i w 30° Infection of the sample from air in room temperature and at 30°	Wszystkie próbki uległy zakażeniu All samples infected									
	pH — 6,0									
Proteus vulgaris	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomonas fluorescens	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Serratia marcescens	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	—	—	—	—		—	+	+	+	+
Bacillus mycoides	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Bacillus megatherium	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Clostridium putryficum	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Clostridium botulinum	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Escherichia coli 2.	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
Escherichia coli ATCC 9294	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Aspergillus niger	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicillium glaucum	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Próbka wystawiona na samozakażenie w temperaturze pokojowej i w 30° Infection of the sample from air in room temperature and at 30°	—	—	Wszystkie próbki uległy zakażeniu All samples infected							

* wzrost po kilku tygodniach — growth observed after few weeks

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Autolizaty drożdżowe zawierające powyżej 21,5% suchej substancji nie podlegają zakażeniom mikrobiologicznym w ciągu 6 miesięcy.
2. W autolizatach o zawartości od 15,6 do 17,0% suchej substancji rozwijają się tylko pleśnie.
3. Badane drobnoustroje okazały się bardziej wrażliwe na wyższe stężenia autolizatów przy *pH* 5,4 niż przy *pH* 6,0.
4. Z badanych bakterii najbardziej odporne na wyższe stężenia autolizatów okazały się: *Proteus vulgaris*, *E. coli*, a najbardziej wrażliwe przetrwalnikujące tlenowce.

LITERATURA

Nowakowska A. 1957: Autoliza drożdży browarniczych i piekarnianych. *Acta Microbiol. Polon.*, 6: 293.
Orla-Jensen S., 1942: The Lactic Acid Bacteria. København.
Parfentiev J., 1954: Yeast as neglected source for the preparation of antibiotics. *Amer. Brewer.*: 39.
Skorodumowa A., 1954: Antibioticzeskije swojstwa drożżej sbrażiwajuszczich uglewody. *Mikrobiołogija* 23: 4.
Stöckli A., 1953: Über die wachstumhemmende Wirkung von Hefe auf die Tetradenbildenden Streptokokken. *Schweiz. Brauerei Rundschau.* 69.

A. Nowakowska

THE INHIBITION OF CONTAMINATING MICROORGANISMS BY YEAST AUTOLYSATES

Summary

The aim of present research was to find a method of storage of yeast autolysates without the addition of preservatives.

It was shown that in autolysates containing more than 21,5% of dry mass no microbial growth was possible.

In autolysates containing 15,6—17,0 of dry mass the growth of bacteria but not of moulds was retarded.

The most resistant to higher concentration of dry mass in autolysates were among tested bacteria *Proteus vulgaris* one strain of *Escherichia coli*.

The most sensitive were sporeforming, aerobic bacilli (table I and II).

SPIS TREŚCI — INHALTSVERZEICHNIS — CONTENTS

Str.

1. S. Szydłowski, M. Rolicka i B. Zabłocki: Otrzymywanie oczyszczonych preparatów kwasu hialuronowego do miareczkowania enzymu — hialuronidazy.
The obtaining of purified hyaluronic acid for the purpose of titration of the enzyme — hylauronidase. 211
2. J. Pawełkiewicz i K. Zodrow: Wytwarzanie kobalamin przez *Corynebacterium diphtheriae.*
The sunthesis of cobalamins by *Corynebacterium diphteriae.* 219
3. J. Duda, Z. Pędziwilk i K. Zodrow: Badanie nad występowaniem witaminu B_{12} u roślin motylkowych.
Studies on the vitamin B_{12} contents of the leguminous plants. 233
4. H. Kaszubiak, E. Malińska i Z. Pędziwilk: Badanie nad wytwarzaniem i składem kobalamin u *Rhizobium meliloti.*
Studies on the production and structure of cobalamins in Rhizobium *meliloti.* 239
5. J. Duda i H. Kaszubiak: Badania nad wływem podłoża na aktywność antybiotyczną promieniowców glebowych.
Studies of the influence of the nutrient-medium on antibiotic activity of *Streptomyces.* 253
6. N. Balicka i J. Sobieszczański: Gleba jako filtr bakteryjny przy rolniczym wykorzystaniu ścieków miejskich.
Der Boden als Bakterienfilter bei der landwirtschaftlichen Verwertung der städtischen Abwässer. 269
7. N. Balicka i J. Sobieszczański: Wpływ gleby na *Escherichia coli* wprowadzoną ze ściekiem (doniesienie). 289
8. A. Nowakowska: Autoliza drożdży browarniczych i piekarnianych.
Autolysis of brewery and bakers yeasts. 293
9. A. Nowakowska: Oporność autolizatów drożdżowych na zakażenia mikrobiologiczne.
The inhibition of contaminating microorganisms by yeast autolysates. 303

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 70,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

Cena zł 25.—

KOMUNIKAT

W DNIACH OD 24 DO 27 LUTEGO 1958 R. W SEMMERINGU KOŁO WIEDNIA ODBĘDZIE SIĘ VI KONFERENCJA AUSTRIACKIEGO ZWIĄZKU MIKROBIOLOGÓW I HIGIENISTÓW. PRZEDMIOTEM KONFERENCJI BĘDĄ NASTĘPUJĄCE ZAGADNIENIA: 1) ZAOPATRZENIE W WODĘ DO PICIA, 2) BUDOWA MIKROORGANIZMÓW I JEJ ZNACZENIE BIOLOGICZNE, 3) ZAGADNIENIA Z DZIEDZINY MIKROBIOLOGII I HIGIENY